

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

**DETECÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO CRESCIMENTO DE
TRICHODERMA spp. ISOLADOS DE COMPOSTO FRENTE À
FITOPATÓGENOS**

FABIANE SILVA BRITO

Florianópolis, maio de 2009.

FABIANE SILVA BRITO

**DETECÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO CRESCIMENTO DE
TRICHODERMA spp. ISOLADOS DE COMPOSTO FRENTE À
FITOPATÓGENOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação
em Agroecossistemas, Centro de Ciências
Agrárias, Universidade Federal de Santa
Catarina.

Orientador: Dr. Paul Richard Momsen Miller
Coorientador: Dr. Marciel João Stadnik

FLORIANÓPOLIS

2009

Fabiane, Silva Brito.

Detecção e Avaliação *in vitro* do crescimento de *Trichoderma* spp. isolados de composto frente a fitopatógenos / Fabiane Silva Brito – Florianópolis, 2009.

80 f.; Ixx, grafs., tabs.

Orientador: Paul Richard Momsen Miller

Co-orientador: Marciel João Stadnik

Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias.

Bibliografia: f. 80.

1. Compostagem; 2. isolamento; 3. *Trichoderma asperellum*; 4. *Hypocrea lixii*; 5. *Trichoderma harzianum*.

TERMO DE APROVAÇÃO

FABIANE SILVA BRITO

DETECÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO CRESCIMENTO DE *TRICHODERMA* ssp. ISOLADOS DE COMPOSTO FRENTE À FITOPATÓGENOS

Dissertação aprovada em 29/05/2009, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, pela seguinte banca examinadora

Prof. Dr. Paul Richard Momsen Miller
Orientador

Prof. Dr. Alfredo Celso Fantini
Coordenador do PGA

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jucinei José Comin
Presidente – CCA/UFSC

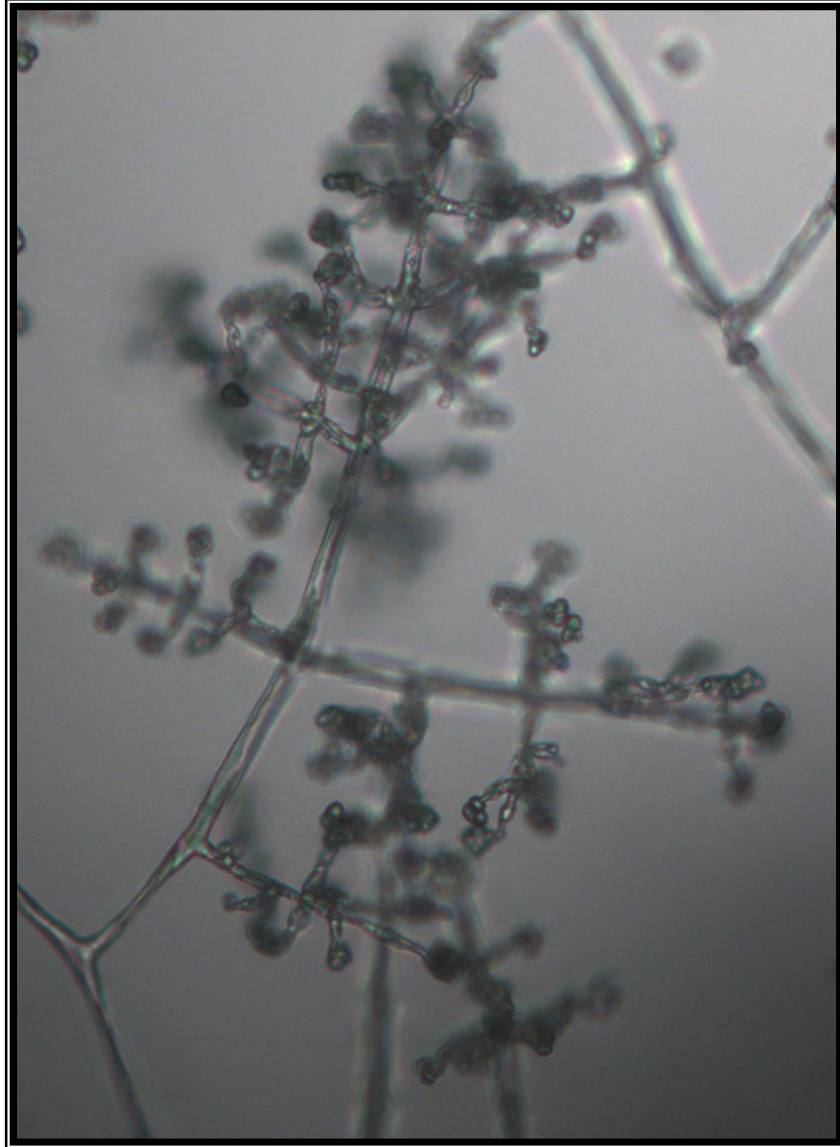
Prof. Dr. Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho
Membro Interno – CCA/UFSC

Prof. Dr. Marciel João Stadnik
Membro Externo – CCA/UFSC

Prof. Dr. Silvio Yoshiharu Ushiwata
Membro Externo – CCA/UFSC

Florianópolis, 29 de maio de 2009.

“Composto de coisas mortas e vivas, lugar em que a sujeira se limpa e os dejetos renascem como hifas e esporos, o solo é sobretudo um fenômeno fúngico.” (Lynn Margulis)



“A vida é auto-renovadora, e os fungos, como recicladores, mantêm toda a superfície planetária fervilhando de vida. Transmigando a matéria, os bolores e os micélios encontram sua vocação.

Criando e destruindo, atraindo e repelindo, garantindo e derrubando, eles são parte integrante da *terra firma*.” (Lynn Margulis)

“... Aos meus pais Fátima e Brito, dedico todo meu trabalho, pois são eles meus maiores incentivadores e a base da minha construção em busca da realização profissional ...”

Agradeço:

Ao Adriano, meu maior companheiro,
por acreditar no meu potencial e no meu trabalho, por
me incentivar nos momentos de descrença e por ser
minha fonte de alegria e inspiração;

Aos meus irmãos Mariane e Fabrício,
que mesmo distantes torcem pela minha vitória;

Aos meus sobrinhos Vitória e Miguel
que me trazem alegria pelo simples fato de existirem;

À Solange, minha sogra, por vibrar
com cada conquista minha e do Adriano e
acreditar no nosso sucesso profissional.

Aos amigos que conquistei durante o
curso, principalmente Gabriela Schirmann,
Cristiane Léis e Ivan Bonjorno que me propiciaram
momentos de grande diversão;

Ao Prof. Dr. Paul Richard Momsen
Miller, pela orientação deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Marciel Stadnik pela
coorientação;

Ao Leandro Borsato, ex-técnico do
Laboratório de Fitopatologia da UFSC, pelo
auxílio;

À Dra. Silvana Vero – UDELAR,
pela identificação dos isolados de *Trichoderma*.

Resumo

A compostagem é um processo que garante o retorno da matéria orgânica e nutrientes ao solo. Estudos apontam o composto como um meio naturalmente supressivo a patógenos de plantas, o que pode estar relacionado com a presença de *Trichoderma* spp. no meio. Os objetivos do presente trabalho foram: comparar três métodos de isolamento de *Trichoderma* spp. do composto; compreender a colonização do composto com uma semana, um e dois anos de maturação comparado com o solo de áreas adjacentes ao pátio de compostagem; e verificar características úteis de *Trichoderma* spp. para a utilização no controle biológico de fitopatógenos. Método de iscas; diluição em série de soluções do solo e plaqueamento direto de fragmentos de composto, foram os métodos utilizados para o isolamento de *Trichoderma* spp. O método de plaqueamento direto foi considerado o mais viável para verificar a presença de *Trichoderma* spp. Esse método foi utilizado para selecionar oito isolados de *Trichoderma* spp.; três do composto de um ano (N1, N2 e N3), três do composto de dois anos (M1, M2 e M3), e dois do solo da mata adjacente ao pátio (S2 e S3). Os isolados M1 e M2 foram identificados, respectivamente, como *Trichoderma asperellum* e *Hypocrea lixii*. Todos os isolados foram comparados com *Trichoderma asperellum* de formulação comercial (TC) quanto ao crescimento micelial, esporulação em BDA (batata-dextrose-ágar) e confrontados com *Sclerotinia sclerotiorum*. Em seguida, apenas um dos isolados (M2) do composto de dois anos e o TC foram confrontados com *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. e *Fusarium solani*. O crescimento micelial entre isolados do composto e do solo foram semelhantes. Isolados do composto de um ano apresentaram a maior esporulação. Isolados do composto de dois anos competiram melhor frente aos patógenos, por espaço e nutrientes, um dos possíveis mecanismos para a supressividade natural do composto. Palavras chave: Compostagem, isolamento, *Trichoderma asperellum*, *Hypocrea lixii*, *Trichoderma harzianum*

Abstract

Composting is an agricultural process that returns organic matter and nutrients to the soil. Studies have shown that compost is naturally suppressive to plant pathogens. This characteristic may be related to the presence of *Trichoderma* spp. in finished compost. This study sought to compare three methods of isolating *Trichoderma* spp. from compost; to study the difference in colonization of week-old, year-old, and two year-old compost, compared to soil from adjacent areas; and to verify characteristics of the *Trichoderma* spp. found, in terms of usefulness in the biological control of plant pathogens. With selective media, a baiting method, serial dilution of soil solution, and direct plating of compost fragments were used to isolate *Trichoderma* spp. Direct plating proved to be the most efficient method to verify presence of *Trichoderma* spp. This method was used to select eight isolates, three from year-old compost (N1, N2, N3), three from two-year old compost (M1, M2, M3), and two from nearby forest soil. The isolates M1 and M2 were identified as *Trichoderma asperellum* and *Hypocrea lixii* (the teleomorph of *Trichoderma harzianum*). These isolates were compared to a commercial formulation of *T. asperellum*, for mycelial growth and sporulation on potato-dextrose agar. These isolates were then confronted with *Sclerotinia sclerotium*. One of the isolates (M2), from two year-old compost, was compared to the commercial strain (TC), in confrontations with *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium solani*. Mycelial growth of compost isolates was similar. Isolates from one year-old showed the highest rate of sporulation. Isolates from two year-old compost competed best against pathogens, competing for space and nutrients, one of the possible mechanisms for the suppressive nature of compost.

Key words: Composting, isolation, *Trichoderma asperellum*, *Hypocrea lixii*, *Trichoderma harzianum*

Sumário

INTRODUÇÃO	1
HIPÓTESE	3
OBJETIVO GERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO I . Revisão Bibliográfica	
1. Compostagem	4
1.2 Microrganismos presentes no Composto	5
1.3 Benefícios na utilização da Compostagem	7
1.4 Supressividade e Maturidade do Composto	9
2. <i>Trichoderma</i> spp.	
2.1 Descrição do gênero	11
2.2 Descrição ecológica:	
2.2.1 Distribuição geográfica de <i>Trichoderma</i> spp.	12
2.2.2 <i>Trichoderma</i> spp. como agente decompositor	13
2.2.3 <i>Trichoderma</i> spp. no crescimento vegetal	13
2.2.4 <i>Trichoderma</i> spp. no biocontrole de outros microrganismos	15
2.2.5 Organismos passíveis de biocontrole por <i>Trichoderma</i> spp.	16
2.2.6 Mecanismos de ação de <i>Trichoderma</i> spp. no biocontrole	17
2.2.7 Interação entre <i>Trichoderma</i> spp., plantas e patógenos	18
3. Referências Bibliográficas	23
CAPÍTULO II . Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. de resíduos compostados	
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	32
2.1 Fontes de <i>Trichoderma</i> spp.	32
2.2 Método de iscas	32
2.3 Diluição em série	34
2.4 Plaqueamento direto	34
3. Resultados	35
4. Discussão	37

5. Conclusão	39
6. Referências Bibliográficas	40
CAPÍTULO III . Presença de <i>Trichoderma</i> spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos	
1. Introdução	44
2. Material e Métodos	
2.1 Fontes de <i>Trichoderma</i> spp.	46
2.2 Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. por plaqueamento direto	46
2.3 Crescimento e esporulação <i>in vitro</i> de diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	48
2.4 Confrontação direta	48
3. Resultados	
3.1 Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. por plaqueamento direto	50
3.2 Crescimento e esporulação <i>in vitro</i> de diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	51
3.3 Confrontação Direta	52
4. Discussão	
4.1 Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. por plaqueamento direto	57
4.2 Crescimento e esporulação <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	58
4.3 Confrontação direta	59
5. Conclusão	63
6. Referências Bibliográficas	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

Introdução

Tradicionalmente, por um longo período, o homem buscou observar e reproduzir métodos naturais para manejar o solo e conduzir seus cultivos. Aproveitando um ciclo natural de decomposição da matéria orgânica, o suprimento do adubo necessário se fazia de forma automática, provido tanto pelo húmus que fornecia o adubo orgânico quanto pelo solo com os elementos naturais (Howard, 2007).

Métodos agrícolas modernos introduziram adubos de alta solubilidade, abandonando o emprego dos resíduos naturais (Howard, 2007). Com processos agrícolas intensivos, adubos e pesticidas químicos foram introduzidos com grande eficácia, mas a utilização desses produtos sintéticos, além de altamente custoso, comprometeu a saúde humana e ambiental. Aplicados em grande quantidade e de forma repetitiva, os métodos químicos causam a quebra de um complexo sistema biológico e, conseqüentemente um intenso desequilíbrio no ecossistema. Por estes motivos, a redução ou eliminação da aplicação de insumos sintéticos na agricultura, é altamente desejável. A volta dos métodos agrícolas tradicionais se faz necessária, pois implica na promoção de um ecossistema de qualidade e resistente a doenças, além de dispensar e reparar os danos causados por métodos agrícolas equivocados.

O controle biológico é uma prática tradicional, que aliada a novos conhecimentos da microbiologia, é atualmente muito estudada, para o controle de fitopatógenos. Este método implica no uso de organismos benéficos para reduzir os efeitos negativos de agentes patogênicos e promover respostas positivas em plantas (Vinale *et al.*, 2008). Comparados aos compostos sintéticos, a utilização e o estímulo desses organismos vivos na proteção de colheitas, ganha um espaço cada vez maior. O controle biológico possui uma ação mais específica e prolongada, e em níveis

suficientes para não permitir danos econômicos à cultura (Melo, 1991). Outrossim, os agentes de biocontrole podem ser facilmente formulados, produzidos a baixo custo e em escala industrial (Vinale *et al.*, 2008).

Resíduos orgânicos compostados também apresentam potencial no controle de patógenos de plantas (Craft & Nelson, 1996; Hoitink & Boehm, 1999; Noble & Coventry, 2005; Howard, 2007). Como a ação supressora dedicada ao composto pode ser resultante da presença de agentes biocontroladores no meio, alguns estudos (Hoitink & Kuter, 1986; Chung & Hoitink, 1990) estão voltados para elucidar a complexa relação entre os agentes de biocontrole como *Trichoderma* spp., matéria orgânica compostada e fitopatógenos.

Trichoderma spp. estão entre os agentes de controle biológico mais estudados e comercialmente vendidos como biopesticidas, biofertilizantes e inoculantes de solo (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004). As espécies desse gênero representam um grande componente da diversidade de vida na Terra e, os números, variedade, papéis, e interações de espécies de *Trichoderma* no ambiente só estão sendo revelados agora (Samuels, 2006). Para a agricultura, além do controle de patógenos, o uso de *Trichoderma* spp. pode oferecer várias vantagens como: decomposição de matéria orgânica, uma microflora competitiva/deletéria através da colonização da rizosfera e melhoria da saúde e crescimento das plantas (Harman *et al.*, 2004).

Dessa forma, conhecer o potencial de microrganismos, em material compostado, para uso no controle biológico, seria uma maneira de enaltecer suas competências, avivar e valorizar um método tradicional de manejo agrícola e controle de patógenos. Além disso, seria uma alternativa de incentivo à utilização de um material derivado da reciclagem de resíduos decorrentes do intenso processo de crescimento humano.

Hipótese

A compostagem pode ser uma fonte natural de *Trichoderma* spp. com potencial no controle biológico de fitopatógenos e com variação na atividade dos fungos isolados de pilhas de compostagem com diferentes estágios de maturação.

Objetivo Geral

Verificar a presença de *Trichoderma* spp. em leiras de compostagem de resíduos orgânicos, em diferentes estágios de maturação, e avaliar as características dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico de fitopatógenos.

Objetivos Específicos

- Comparar a eficiência de três métodos de isolamento de *Trichoderma* spp., método de iscas, diluição em série e plaqueamento direto; de composto orgânico com dois anos de maturação.
- Isolar *Trichoderma* spp. de amostras de composto orgânico de uma semana, um e dois anos de maturação.
- Avaliar *in vitro* os isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao crescimento micelial e esporulação e compará-los com isolados de *Trichoderma* spp. do solo e a um isolado de formulação comercial.
- Verificar *in vitro* o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. frente aos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. e *Fusarium solani*.

CAPÍTULO I. Revisão Bibliográfica

1. Compostagem

A compostagem é um processo viável de aproveitamento racional de resíduos orgânicos que garante o retorno da matéria orgânica e nutrientes ao solo. É um método antigo de reciclagem onde a matéria orgânica é transformada em adubo orgânico. A compostagem, como um processo controlado e de decomposição em grande escala, ficou conhecida pela ciência ocidental com Sir Albert Howard, na Índia Central, entre os anos de 1924 e 1931, no processo Indore.

Atualmente, a compostagem é descrita como um processo aeróbico controlado, para a redução de resíduos orgânicos a materiais mais estáveis (Epstein, 1997). O processo é desenvolvido por uma população diversificada de microrganismos que se alteram sucessivamente em apenas duas fases. A primeira predominantemente termofílica, quando ocorrem reações bioquímicas mais intensas, e a segunda ou fase de maturação, quando ocorre o processo de humificação. Contudo, de acordo com Hoitink & Kuter (1986) o processo de compostagem envolve basicamente três fases. Na fase inicial, ocorre a expansão de microrganismos mesófilos, a intensificação da ação de decomposição, principalmente de compostos simples e de fácil degradação, havendo liberação de calor e elevação rápida da temperatura. A fase termofílica, que é caracterizada por temperaturas superiores a 45°C, com plena ação de microrganismos termófilos e intensa decomposição do material. A fase mesófila ou de estabilização, é aquela em que a temperatura e a taxa de decomposição diminuem e microrganismos mesofílicos recolonizam o composto degradando substâncias orgânicas mais resistentes.

Uma quarta fase conhecida como maturação, também de extrema importância, já foi relatada (Epstein, 1997). Essa é um período de grande formação de substâncias

húmicas, baixa atividade biológica e baixa capacidade de auto-aquecimento pelo composto. A partir daí, a decomposição prosseguirá quando o composto orgânico for aplicado ao solo liberando nutrientes.

1.2 Microrganismos presentes no composto

A atividade biológica em uma leira de compostagem é complexa e depende de fatores e relações ecológicas entre diferentes populações de microrganismos (Tabela 1) e destas com fatores ambientais da leira (Epstein, 1997). É um processo biológico que envolve uma gama de microrganismos em sucessão, que decompõe matéria e compostos orgânicos (Epstein, 1997) e que afetam e são afetados por fatores físicos e bioquímicos envolvidos durante o processo.

Tanto a fase termofílica como a mesofílica envolvem microrganismos aeróbicos (Hoitink & Kuter, 1986). Esses podem ser classificados como microrganismos mesófilos, que suportam temperatura de 25 a 45°C e dominam o processo na sua fase inicial; e termófilos, que suportam temperaturas que ultrapassam os 45°C, fase de intensa atividade no meio (Epstein, 1997).

O grupo de microrganismos mesófilos usa o oxigênio disponível para obter energia, o que libera CO₂ e água metabólica, além de calor. Este calor será conservado no interior da leira elevando rapidamente a temperatura do substrato. Quando a temperatura atinge o limite de 45°C os microrganismos mesófilos morrem ou tornam-se dormentes. Estes deverão recolonizar a biomassa da compostagem quando a temperatura decrescer. A partir desse ponto, o grupo termófilo, que cresce melhor entre 45 e 70°C, se torna ativo, multiplicando-se rapidamente e ocupando o lugar dos mesófilos na maior parte da leira de compostagem, consumindo rapidamente o substrato disponível. A atividade do grupo termófilo gera uma quantidade de calor ainda maior

que o grupo anterior e a temperatura dentro da leira podem ultrapassar em certas condições 70°C. Ao tempo que nutrientes e energia contida no substrato se tornam escassos, a atividade deste grupo diminuiu e a temperatura decresce. Por consequência, abre espaço para a recolonização de certos microrganismos mesófilos. Este grupo dominará a massa do material até que toda fonte energética de fácil obtenção seja utilizada (Inácio & Miller – dados não publicados).

O fluxo de comunidades microbianas selecionadas pelas mudanças contínuas das condições ambientais (dentro da leira) é determinado pelas atividades anteriores dos microrganismos. Segundo Miller (1993), na dinâmica da comunidade microbiana da compostagem, muitos dos fatores seletivos que favorecem ou desfavorecem diferentes populações são eles mesmos resultados da existência dessas populações e da sua atividade. Logo, microrganismos mesófilos não desaparecem simplesmente devido às altas temperaturas, eles são também os agentes da elevação inicial da temperatura. Além da temperatura, outros fatores como a umidade, o pH, a disponibilidade de energia, os nutrientes, o oxigênio e a composição da matéria orgânica determinam a qualidade da compostagem e a comunidade microbiológica presente na mesma (Epstein, 1997).

De acordo com Stratton e colaboradores (1997), bactérias, actinomicetos e fungos mesofílicos e termofílicos são responsáveis pela degradação dos resíduos celulósicos, pectínicos e lignínicos. As bactérias têm o efeito mais significativo no processo de decomposição, sendo o grupo mais ativo na fase inicial da compostagem. São responsáveis pela transformação de cerca de 80 a 90% do material, decompondo facilmente amido e proteínas. Os complexos celulósicos e lignínicos são decompostos em seguida, depois de esgotada a oferta de materiais de mais fácil decomposição, sendo realizada por actinomicetos como *Streptomyces*, que suportam altas temperaturas (Stratton *et al.*, 1997). Apesar da presença de fungos durante todo o processo de

decomposição, sua presença no meio se faz principalmente em condições aeróbicas que caracterizam o final do processo. Nesta fase, a disponibilidade de água decresce, favorecendo o crescimento micelial de fungos, mais que bactérias (Miller, 1993).

1.3 Benefícios da utilização da compostagem

Entre inúmeros benefícios alcançados com a realização do processo de compostagem, encontra-se a diminuição do volume de resíduos orgânicos causadores de intenso impacto ambiental. Atividades agrícolas, urbanas e industriais geram resíduos, excedentes e subprodutos orgânicos, que podem ser reaproveitados e reciclados pelo processo de compostagem. A agricultura acumula restos de culturas agrícolas, partes folhosas de vegetais ou cascas de grãos, frutos não comercializados e esterco. As mais diversas agroindústrias representam fontes de resíduos orgânicos de origem vegetal e animal, enquanto os parques industriais geram restos de comida e restos de manutenção das áreas verdes. Os centros urbanos e suas centrais de abastecimento geram resíduos e excedentes de restos de comida, frutas e verduras. Há ainda a serragem das serrarias e os lodos de esgoto produzidos nas estações de tratamento.

Todos esses materiais podem ser aproveitados na compostagem, num processo de baixo custo, que reduz o volume e a massa do material original, necessitando apenas de um espaço adequado e de um bom monitoramento. O tratamento destes resíduos, além de garantir a reciclagem de nutrientes da matéria orgânica, pode ajudar na eliminação ou redução de patógenos a níveis seguros, no composto final. Isso propicia o seu uso benéfico, permitindo a utilização de compostos orgânicos higienizados e livres de patógenos em lavouras e possibilita a melhoria da qualidade do solo e plantas onde o material é aplicado.

Tabela 1. Bactérias, fungos e actinomicetos identificados na compostagem de diferentes substratos e em diversos sistemas.

Espécies / Bactérias	Espécies / Fungos	Espécies / Actinomicetos
<i>Bacillus</i>	Zigomicetos	<i>Actinobifida chromogena</i>
<i>B. brevis</i>	<i>Absidia</i>	<i>Nicrobispora bispora</i>
<i>B. circulans complex</i>	<i>A. ramosa</i>	<i>Micropolyspora faeni</i>
<i>B. coagulans type A</i>	<i>Absidia sp.</i>	<i>Nocardia sp.</i>
<i>B. coagulans type B</i>	<i>Mortierella turficola</i>	<i>Pseudonocardia thermophila</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Mucor</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>B. spharicus</i>	<i>M. miehei</i>	<i>S. rectus</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>M. pusillus</i>	<i>S.thermofuscus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizomucor sp.</i>	<i>S. thermoviolaceus</i>
<i>Clostridium</i>	Ascomicetos	<i>S. thermovulgaris</i>
<i>C. thermocellum</i>	<i>Allescheria terrestris</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
<i>Clostridium sp.</i>	<i>Chaetonium thermophilum</i>	Thermoactinomyces
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Dactylomyces crustaceus</i>	<i>T. vulgaris</i>
	<i>Myriococcum albomyces</i>	<i>T. sacchari</i>
	<i>Talanomyces (Penicillium)</i>	Thermomonospora
	<i>T. dupontii</i>	<i>T. curvata</i>
	<i>T. emersonni</i>	<i>T. viridis</i>
	<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermomonospora sp.</i>
	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	
	<i>Thielavia</i>	
	<i>T. thermophila</i>	
	<i>T. terrestris</i>	
	Basidiomicetos	
	<i>Coprinus</i>	
	<i>C. lagopus</i>	
	<i>Coprinus sp.</i>	
	<i>Lenzites sp.</i>	
	Deuteromicetos	
	<i>Aspergillus</i>	
	<i>A. fumigatus</i>	
	<i>Humicola</i>	
	<i>H. grisea</i>	
	<i>H. insolens</i>	
	<i>H. lanuginosa</i>	
	<i>H. stellata</i>	
	<i>Sporotrichum thermophile</i>	
	<i>Malbranchea pulchella</i>	
	<i>Scytalidium thermophilum</i>	
	(formalmente conhecido como	
	<i>Torula thermophila</i>)	
	<i>Mycelia Sterilia</i>	
	<i>Papulaspora thermophila</i>	

Fonte: Miller, F. C, 1993, p530-534. Citando diversos autores.

Compostos orgânicos são comumente usados na agricultura para melhorar a qualidade do solo, adicionando nutrientes e reciclando resíduos (Abawi & Widner, 2000), sustentando e recompondo a fertilidade do solo, tanto em aspectos quantitativos como qualitativos (Howard, 2007). Outrossim, é considerado o cimento para a formação e sustentação da coesão das partículas do solo, auxiliando na manutenção da porosidade e da aeração do meio, assim como, garantindo o suprimento de matéria orgânica para a microbiota ali presente (Howard, 2007).

1.4 Supressividade e maturidade do composto

A incorporação de matéria orgânica no solo também contribui para o controle biológico, uma vez que estes materiais estimulam a atividade microbiana e as interações entre as populações desta comunidade (Melo, 1998). Em cultivos acometidos por doenças, a adição de resíduos orgânicos pode aumentar o número de microrganismos ativos e conseqüentemente, as chances de que alguns deles alterem o desempenho de patógenos. Lumsden *et al.*, (1983) verificaram a diminuição da incidência de doenças causadas por *Pythium* e *Rhizoctonia* spp. pela adição de matéria orgânica ao solo.

Diferenças observadas entre um meio contendo apenas matéria orgânica, sem tratamento prévio, e a matéria orgânica compostada, já foram relatadas. De acordo com Hoitink & Kuter (1986) o uso de composto levou a total ausência ou à diminuição de patógenos, como *Rhizoctonia solani*, causador de doenças em plantas. Segundo os mesmos, algumas vezes a supressividade da compostagem é alta o suficiente ao ponto de dispensar o uso de fungicidas e garantir ao cultivo produtos livres de patógenos.

Devidos às suas propriedades químicas, físicas e biológicas (Epstein, 1997), alguns compostos podem ser naturalmente supressivos (Howard, 2007), principalmente a doenças causadas por *Pythium* e *Phytophthora* spp. (Craft & Nelson, 1996; Hoitink &

Boehm, 1999). Essa supressividade natural de materiais compostados foi observada desde a década de 50, quando nos Estados Unidos e Austrália, se utilizava cascas de várias espécies diferentes de árvores, turfa, para se tentar controlar a podridão da raiz que provocava sérios problemas nas indústrias. A partir disso, foi observado que o “envelhecimento” ou a compostagem dos meios enriquecidos com cascas de árvores suprimiu naturalmente *Pythium* e *Phytophthora* (Hoitink *et al.*, 2006). Epstein (1997) apresenta uma relação de microrganismos, citados por vários autores, causadores de doenças em plantas, que foram suprimidos pela ação de composto aplicado em cultivos. Estão entre eles *Rhizoctonia solani*, *Fusarium*, *Sclerotinia rolfsii* e *Pythium*.

Os benefícios resultantes da utilização de composto são decorrentes da alta qualidade do material, principalmente do produto final e para assegurar suas propriedades, é necessário considerar a idade do material compostado. Este fator garante a alta capacidade do composto no controle de fitopatógenos, por afetar a atividade de possíveis antagonistas (Hoitink & Kuter, 1986; Epstein, 1997). Propágulos de *Rhizoctonia solani* sobreviveram à presença de *Trichoderma harzianum* colonizando composto imaturo, o que não ocorreu quando da presença do antagonista no composto maturo (Hoitink & Kuter, 1986). O material recém compostado pode se encontrar em uma fase ainda imatura, provido de toxinas e ácidos fenólicos, derivados da decomposição anaeróbica, capaz de interferir na atividade de possíveis microrganismos supressivos. Já na fase de maturação do composto e possível “envelhecimento”, a composição microbiológica estará mais equilibrada, desprovida de patógenos e microrganismos anaeróbicos (Stratton *et al.*, 1997). Além disso, o produto estará livre de substâncias fitotóxicas que podem retardar a germinação de sementes ou causar danos às plantas ou organismos presentes no solo (Epstein, 1997). Assegurada a maturidade do composto, sua aplicação no solo pode ser uma alternativa positiva já que o composto

poderá ser uma fonte de microrganismos supressivos de patógenos.

Alguns estudos recomendam a utilização do composto como substrato para a propagação de populações de fungos com ação no controle biológico de fitopatógenos (Krause *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2004; Hoitink *et al.*, 2006; Leandro *et al.*, 2007).

2. *Trichoderma* spp.

2.1 Descrição do gênero

Trichoderma é um gênero classificado como imperfeito, pertencente à Subdivisão Deuteromycotyna, ordem Hifomicetes e família Moniliaceae (Melo, 1991). Em 1794, o gênero *Trichoderma* foi descrito por Persoon, incluindo quatro espécies na descrição, e em 1969 foi reclassificado por Rifai. A partir daí, um maior número de espécies foi agregado ao gênero, chegando à atualidade com cerca de 83 taxons (espécies, formas e variedades), incluindo *Trichoderma* e *Hypocrea* (Samuels, 2006). *Hypocrea* é o gênero que constitui uma das duas fases que *Trichoderma* possui, denominada de teleomórfica. Nesta fase o gênero *Hypocrea* é classificado como ascomiceto da ordem Hypocreales, onde predomina uma etapa sexual. A segunda fase, denominada anamórfica, prevalece uma etapa assexual, que parece ser independente da fase teleomórfica, seja em nível de indivíduo ou de população (Harman *et al.*, 2004).

As espécies do gênero *Trichoderma* apresentam micélio constituído de hifas hialinas muito ramificadas e de parede lisa. Em meio de cultura, as colônias apresentam inicialmente, superfície lisa e quase translúcida, tornando-se posteriormente flocosas e quase compactas (Ethur, 2006). O crescimento rápido em culturas, a produção de um micélio aéreo esparso, o tipo de ramificação dos conidióforos e o modo de disposição das fiálides são características utilizadas para distinguir as espécies desse gênero (Bisset, 1991). Porém, os poucos caracteres morfológicos disponíveis são variáveis, em

certa medida, levando a sobreposição entre as espécies, o que torna a identificação das espécies de *Trichoderma* notoriamente difícil (Samuels, 2006). Tal fato poderia explicar porque tão poucas espécies foram descritas na maior parte da vida do gênero.

2.2 Descrição Ecológica:

2.2.1 Distribuição geográfica de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. é usualmente considerado um gênero de fungo de solo de vida livre, universalmente presente neste meio, em todas as zonas climáticas. Entretanto algumas espécies podem ser cosmopolitas (ex., *T. harzianum*) ou limitadas na sua distribuição geográfica (ex., *T. viride*). *Trichoderma stromaticum* tem possivelmente a distribuição mais restrita entre as espécies do gênero. É encontrado apenas associado a plantas de cacau ou ao agente patogênico *Crinipellis perniciosus*, causador da vassoura de bruxa no cacau (Samuels, 2006).

Uma forte influência na distribuição das espécies de *Trichoderma* é a temperatura. Espécies de regiões frias apresentam baixa temperatura ótima, como é o caso de *Trichoderma oiride* e *Trichoderma polysporum* que conseguem bom desenvolvimento a 7°C (Danielson & Davey, 1973) e *Trichoderma minutisporum* (Samuels 2006). *Trichoderma Koningii*, *Trichoderma hamatum* suportam até 35°C, *Trichoderma harzianum* 38°C e *Trichoderma pseudokoningii* e *Trichoderma satwnisporum* 40°C. Essas espécies são mais comuns em regiões de clima tropical, sendo aquelas que suportam uma maior amplitude de variação de temperatura, consequentemente são as que possuem maior distribuição. Outros fatores como umidade, nutrientes, pH, tipo de solo, microbiota, aeração e teor de matéria orgânica influenciam na distribuição das espécies deste gênero (Danielson & Davey, 1973), assim como na sobrevivência no solo ou em substrato (Howell, 2003).

2.2.2 *Trichoderma* spp. como agente decompositor

Espécies do gênero *Trichoderma* são conhecidas pela sua alta capacidade em produzir enzimas que degradam celulose e quitina (Melo, 1991; Harman *et al.*, 2004). Nas Filipinas, *T. harzianum* spp. é inoculado em pilhas de compostagem para acelerar a degradação da celulose (Bengwayan, 2007). *Trichoderma reesei* foi considerado, segundo Samuels (2006), como a melhor espécie conhecida para a produção comercial de celulase. Além da celulose e quitina, *Trichoderma* spp. são capazes de degradar hidrocarboneto, clorofenicol, polissacarídeos e pesticidas xenobióticos usados na agricultura (Howell, 1998; Harman *et al.*, 2004).

2.2.3 *Trichoderma* spp. no crescimento vegetal

Algumas espécies de *Trichoderma* podem promover o crescimento de plantas, aumentar a germinação e a emergência de sementes (Melo, 1998). Isto se dá numa relação aparentemente simbiótica e não parasítica, entre o fungo e a planta, onde o fungo ocupa o nicho nutritivo e a planta é protegida de doenças. Após desenvolver-se na espermosfera, *Trichoderma* spp. podem ser utilizados na inoculação de sementes, pois acabam acompanhando o desenvolvimento da raiz da nova planta (Harman, 2000) contribuindo para o pioneirismo do fungo nessa estrutura (Chao *et al.*, 1986). A capacidade do fungo em colonizar as raízes é um fator fundamental para sua interferência no crescimento e na produtividade da planta (Harman, 2000; Samuels, 2006). Kleifeld & Chet (1992) verificaram que aplicação de *Trichoderma* spp. aumentou significativamente a porcentagem de germinação, o peso seco de plântulas e a área foliar de plantas de pimentão.

Ao estudar fungos associados a sementes de cevadilha vacariana, *Bromus auleticus*, coletadas nas plantas e no solo, Silva e colaboradores (2007) deduziram que

Trichoderma spp. cumprem uma função específica na regeneração natural da planta, atuando no sentido de preservar a sanidade das sementes durante sua vida no solo, e constituindo uma relação de mutualismo. O potencial de *Trichoderma* também foi relatado por Lynck (1992) como agente biológico na agricultura, estimulando o crescimento de plantas, visto que proporcionou aumento de 54 a 100% de alface, quando incorporado ao composto utilizado na adubação. Melo (1996), utilizando duas linhagens mutantes de *T. koningii* hiperprodutoras de celulase e antagonicas a *S. sclerotiorum*, observou aumento na emergência e no peso seco dos pepineiros. Sementes de milho inoculadas com *T. harzianum* resultaram em plantas com maior acúmulo de matéria seca nas raízes (Resende *et al.*, 2004). Em plantas jovens de milho, os pêlos radiculares são colonizados por hifas de *T. harzianum* que se estabelecem nas raízes, crescendo junto com o sistema radicular e permanecendo funcional durante todo o ciclo da cultura anual (Harman, 2000).

A promoção de crescimento vegetal ocasionada por *Trichoderma* spp. pode envolver alguns fatores ainda poucos esclarecidos, como a produção de hormônios e vitaminas, conversão de materiais a uma forma útil para a planta, absorção e translocação de minerais e controle de patógenos (Melo, 1991). Espécies de *Trichoderma* produzem ácidos orgânicos que reduzem o pH do solo e permitem a solubilização de fosfato, micronutrientes e minerais como ferro, manganês e magnésio, úteis para o metabolismo da planta (Harman *et al.*, 2004). Segundo Ethur *et al.*, (2005), a variabilidade entre os isolados de *Trichoderma* spp., quanto à interferência no crescimento de vegetais, consiste, principalmente, na produção de metabólitos secundários e na sua capacidade de ser competitivo na rizosfera.

2.2.4 *Trichoderma* spp. no biocontrole de outros microrganismos

Evidências sugerem que *Trichoderma* spp., além de saprófitas e simbiontes, podem ser oportunistas e parasitas de outros fungos (Samuels, 2006). Com base nisso, as interações de espécies desse gênero com vários fitopatógenos de diferentes culturas, tem sido objeto de estudo de muitas pesquisas. O uso de *Trichoderma* spp. já foi documentado para o controle de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. (Melo, 1998). *Trichoderma virens* é efetivo contra “damping-off” causado por *S. sclerotiorum* (Huang *et al.*, 2000) e *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* Kühn (Lumsden & Locke, 1989). No algodão, a atividade de supressão tem sido relatada contra *Rhizoctonia solani* (Howell, 1982), *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Zhang *et al.*, 1996). No cacau, *T. stromaticum* é eficaz no controle de *Crinipellis pernicioso*, patógeno causador da vassoura de bruxa (Sanogo *et al.*, 2002; Samuels, 2006).

Do ponto de vista do biocontrole, *T. harzianum* é a espécie mais estudada além de outras espécies como *T. koningii*, *T. viride*, *T. hamatum*, e *T. pseudokoningii*. Esse gênero apresenta características essenciais para um agente de controle biológico, como ausência de impacto negativo ao meio ambiente, presença de estruturas de reprodução de fácil propagação, principalmente em substratos naturais (Spiegel & Chet, 1998), capacidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, além de conter populações de patógenos em condições de solo diferentes (Vinale *et al.*, 2008).

Apesar dos esporos não apresentarem ação direta comprovada na ação de biocontrole (Lewis & Papavizas, 1984), a utilização do *Trichoderma* spp. na forma comercial, para o controle de fitopatógenos, é realizada à base de esporos de várias espécies do gênero, como *T. harzianum*, *T. polysporum* e *T. reesei*. A atividade de biocontrole é relatada para populações de *Trichoderma* de $10^5 - 10^7$ UFC/g crescidas em meio controlado, como solo fumigado (Leandro *et al.*, 2007) e aplicado no solo em porções de um litro/m², com 10^8 esporos/litro (Melo, 1991). Segundo Melo (1996), os

conídios e clamidósporos de *Trichoderma* são formulados e utilizados para o tratamento de solos, sementes, bulbos e estolões, e ainda, pulverizados na parte aérea das plantas.

2.2.5 Organismos passíveis de biocontrole por *Trichoderma* spp.

Entre os fungos de solo, causadores de doenças em plantas, encontram-se *Fusarium solani*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia sclerotiorum* estudados, principalmente pelos danos que causam em plantas de interesse econômico.

Fusarium solani é um fungo filamentosos, anamórfico, que apresenta variações sobre o aspecto morfológico e patogênico. É causador de doenças que atacam o sistema radicular das plantas, sendo comumente isolado de raízes que não apresentam sintomas da doença (Gordon & Martyn, 1997).

Rhizoctonia é um gênero cujas espécies são causadoras de podridão nas sementes, conhecidas como damping-off e podridão da raiz. Neste gênero são encontrados os fungos que apresentam um micélio estéril, que não forma esporos assexuados (Krügner & Bacchi, 1995).

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo capaz de provocar doença em cerca de 400 espécies de plantas, em todos os estágios de crescimento e desenvolvimento e de infectar flores, folhas, frutos e estames (Abdullah *et al.*, 2008). É promotor do mofo branco, doença que se caracteriza pela podridão úmida coberta por um micélio branco algodinoso na superfície do solo e/ou no tecido hospedeiro, produzindo estruturas de resistência denominadas escleródios (Cardoso, 1990 citado por Ethur *et al.*, 2001). A partir dos escleródios, propágulos que facilitam a permanência do patógeno no solo, o fungo pode produzir germinação carpogênica ou micelogênica (Purdy, 1979). A primeira é causadora do tombamento de pré e pós emergência e a segunda, responsável pelo desenvolvimento do mofo branco da parte aérea (Ethur *et al.*, 2005).

Apesar de serem considerados os maiores causadores das doenças e dos ataques às culturas, os fungos denominados fitopatógenos são na verdade, um assunto secundário. Suas atividades são resultantes da quebra de um complexo sistema biológico, formado pelo solo, plantas e animais, causado por métodos agrícolas inadequados e pelo empobrecimento da terra. Seus verdadeiros papéis são de indicadores, mostrando as variedades não adaptadas, cultivadas de forma inadequada e plantas impropriamente nutridas. Com base nisso, deve-se considerar os parasitas como uma parte integrante de todo sistema racional agrícola (Howard, 2007).

2.2.6 Mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. no biocontrole

A ação do fungo no biocontrole de fitopatógenos ocorre devido aos mecanismos de hiperparasitismo, antibiose e competição ou uma combinação desses. No hiperparasitismo, espécies desse gênero conseguem detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, talvez em resposta a estímulos químicos produzidos pelas hifas do hospedeiro, formando estruturas semelhantes à apressórios e enrolando-se fortemente em toda extensão da hifa para, então, penetrar e digerir-la (Melo, 1991). Tal mecanismo já foi demonstrado por vários pesquisadores através da interação entre *T. harzianum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* e *Sclerotium rolfsii* (Melo, 1991).

Trichoderma spp. é um forte produtor de esporos e uma fonte de enzimas degradadoras de parede celular. O arsenal antifúngico de *Trichoderma* inclui grande variedade de enzimas líticas (ex.: exoglucanase, endoglucanase, celobioase, celulasas, quitinases, glucanases), a maior parte desempenhando um importante papel no controle biológico (Papavizas, 1985; Vinale *et al.*, 2008). A capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie (Martins-Corder & Melo, 1998). São capazes de parasitar e destruir até

mesmo as estruturas de resistência dos fitopatógenos, como os escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. A nutrição obtida destas fontes pode também afetar o grau de hiperparasitismo (Melo, 1991).

No mecanismo de antibiose, *Trichoderma* spp. produzem metabólitos secundários com atividade biológica. Estes metabólitos incluem um variado grupo de compostos naturais quimicamente diferentes, possivelmente relacionados à sobrevivência do organismo produtor, como competição contra outros micro e macrorganismos, simbiose, transporte metálico, diferenciação além de antibióticos capazes de inibir o crescimento microbiano (Demain & Colmilho, 2000 citado por Vinale *et al.*, 2008). Diferentes cepas chegam a produzir mais que 100 tipos de metabólitos com potencial antifúngico (Harman *et al.*, 2004), sendo a capacidade de biocontrole possivelmente correlacionada à produção de antibióticos.

Competição por carbono, nitrogênio e outros fatores de crescimento, somados à competição por espaço ou sítios específicos de competição, também são formas utilizadas por *Trichoderma* para controlar populações de fitopatógenos (Vinale *et al.*, 2008). *Trichoderma* também possui grande capacidade de mobilizar nutrientes do solo tornando-se mais eficiente e competitivo que outros microrganismos. Segundo Harman *et al.*, (2004), *Trichoderma* sp. compete por exsudados liberados pelas sementes durante a germinação que estimulam a germinação de propágulos de fungos fitopatógenos.

2.2.7 Interação entre *Trichoderma* spp., plantas e patógenos

A supressão de uma doença mediada por agentes de biocontrole e o êxito do controlador, é a consequência das interações entre plantas, agentes patogênicos e a comunidade microbiana presente no ecossistema solo. Deste modo, compreender as relações entre organismos está entre os fatores fundamentais para a manutenção do

equilíbrio natural das populações e dos ciclos biológicos (Schafer & Kotanen, 2003).

Além de promover o crescimento de plantas e a disponibilidade de nutrientes, *Trichoderma* spp. podem oferecer proteção às plantas contra fitopatógenos. Conídios de *T. harzianum*, até mesmo em baixas condições nutricionais, requerem apenas de 14 a 18 horas para completar a germinação e iniciar o crescimento micelial, e em pouco tempo colonizar a superfície da planta o bastante para efetivar a interceptação da germinação do patógeno (Lifshitz *et al.*, 1986). De acordo com Howell e colaboradores (2000), pesquisas sobre o mecanismo de biocontrole do agente *Trichoderma virens* para suprimir *Rhizoctonia solani* em sementes de algodão, mostram que micoparasitismo e produção de antibióticos não são os maiores contribuidores para o sucesso do controle biológico. Segundo os autores, um possível mecanismo para atividade de biocontrole em *Trichoderma* sp. é o estímulo à resposta de defesa do hospedeiro a fitopatógenos. Uma variedade de cepas de *T. virens*, *T. asperellum*, *T. atroviride* e *T. harzianum* são capazes de induzir mudanças metabólicas nas plantas aumentando a resistência a uma ampla taxa de patógenos. As espécies de *Trichoderma* são capazes de ativar a expressão de genes, denominados “elicitors” ligados a sistemas de resposta de defesa da planta (Harman *et al.*, 2004).

Alguns isolados de *Trichoderma* sp. induzem resistência sistêmica nas plantas ativando a síntese de proteínas relacionadas à patogênese, antes mesmo que o patógeno invada a planta hospedeira (Harman *et al.*, 2004). Para a elucidação dos caminhos que envolvem a indução de resistência, muitos progressos têm ocorrido. Em muitos casos, o ácido salicílico e o ácido jasmônico, juntamente com o etileno ou óxido nítrico, induzem uma cascata de eventos que provocam a produção de uma grande variedade de metabólitos e proteínas com diversas funções na planta, modificando o proteoma vegetal (Harman *et al.*, 2004). Fungos semelhantes a *Trichoderma hamatum* 382 (T382)

não possuem esse efeito (Zhang *et al.*, 1996), o que não compromete o controle de fitopatógenos, já que os mecanismos pelo qual microrganismos rizosféricos induzem resistência sistêmica nas plantas, são diferentes (Harman *et al.*, 2004).

No algodão sementes tratadas com *T. virens*, efetivo no biocontrole, desencadeia na planta uma resposta de defesa durante o desenvolvimento das raízes da muda. Uma parte desta resposta se deve ao estímulo da síntese de terpenóides no sistema da raiz, que é a porção da planta colonizada pelo agente de biocontrole. A síntese de terpenóides pela planta hospedeira se deve à colonização e penetração da epiderme e do tecido cortical da raiz (Hoitink *et al.*, 2006). As classes de diferentes metabólitos, como proteínas e compostos de baixo peso molecular, produzidos por espécies de *Trichoderma*, também podem atuar como indutores de resistência (Harman, 2004). O grau de proteção promovido por isolados de *Trichoderma* spp. que induz resistência sistêmica em plantas, pode ser tão efetivo como o promovido por fungicidas (Hoitink *et al.*, 2006). Por exemplo, o grau de controle promovido por *Trichoderma harmatum* - T 382 contra *Phytophthora capsici* foi tão efetivo como o promovido por solução de metalaxyl (Khan *et al.*, 2004).

A habilidade de *Trichoderma* spp. em promover um controle sistêmico da doença pode ser afetada conforme alguns fatores, como o tipo de substrato, podendo variar o grau de supressão obtido. Ao verificar o papel do substrato no crescimento de plantas, na resistência do hospedeiro à doenças e na habilidade de inóculo de *Trichoderma*, Hoitink e colaboradores (2006) revelaram que o controle de doenças foliares promovido por *Trichoderma* spp. é mais efetivo em plantas crescidas em meio enriquecido com composto que em substrato de musgo que não promove o crescimento de microrganismos. *Trichoderma harmatum* – T 382 foi identificado como o promotor do grau mais significativo de controle de doenças foliares, dentre 500 microrganismos

rizosféricos isolados de dois de 80 lotes diferentes de compostos, naturalmente supressivos de doenças foliares (Sid Ahmed *et al.*, 2000).

3. Referências Bibliográficas

Abawi, G.S.; Widner, T.L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 37-47, 2000.

Abdullah, M. T.; Ali, N. Y.; Suleman, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, p. 1354-1359, 2008.

Bengwayan, M. A. Rapid composting, a fast way to cash and safe vegetables. Disponível em: www.teachamantofish.org.uk/articles/RapidCompost.php. Acesso em: 29 de outubro, 2007.

Bisset, J. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section *Pachybasium*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2373-2417, 1991.

Chao, W. L. Nelson, E. B.; Harman, G. E.; Hoch, H. C. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. **Phytopathology**, v.76, n.1, p.60-65, 1986.

Chung, Y. R.; Hoitink, H. A. J. Interactions between thermophilic fungi and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in a bark compost-amended container medium. **Phytopathology**, v. 80, p. 73-77, 1990.

Craft, C. M.; Nelson, E. B. Microbial properties of composts that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, p. 1550-1557, 1996.

Danielson, R. M.; Davey, C. B. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. **Soil Biol. Biochem.** v. 5, p. 495-504, 1973.

Epstein, E. **The science of composting**. Technologic Publishing, P. A. 487p., 1997.

Ethur, L. Z.; Blume, E.; Muniz, M.; Silva, A. C. F.; Stefanelo, D. R.; Rocha, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

Ethur, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. Tese (Doutorado em Agronomia) UFSM – Santa Maria – RS, 2006.

Ethur, L. Z.; Cembranel, C. Z.; Silva, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 31, n.5, p. 885-887, 2001.

Gordon, T. R.; Martyn, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 111-128, 1997.

Harman, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.377-392, 2000.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56. 2004.

Hoitink, H. A. J.; Boehm, M. J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 427-446, 1999.

Hoitink, H. A. J.; Kuter, G. A. Effects of composts is growth media on soilborne pathogens. In: Chen, Y.; Avnimelech, Y. (Ed.). **The role of organic matter in modern agriculture**. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht – Boston – Lancaster, 1986.

Hoitink, H. A. J., Madden, L. V.; Dorrance, A. E. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. **Phytopathology**, v. 96, p. 186-189, 2006.

Howard, S. A. **Um testamento agrícola**. Tradução de Eli Lino de Jesus. Apresentação, revisão técnica e notas de rodapé de Luiz Carlos Pinheiro Machado. São Paulo: Expressão Popular, 360p., 2007. Traduzido da edição especial da Rodali Press, USA, 1976.

Howell, C. R. Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 72, p. 496-498, 1982.

Howell, C.R. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**., v. 87, p. 4-10, 2003.

Howell, C. R.; Hanson, L. E.; Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v. 90, p. 248-252, 2000.

Howell, C. R. The role of antibiosis in biocontrol. p.173-184 In: Harman, G. E.; Kubicek, C. P. (Eds). **Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications**. Taylor & Francis, London, 1998.

Huang, H.C.; Bremer, E.; Hynes, R.K.; Erickson, R.S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold by dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v.18, p.270-276, 2000.

Khan, J.; Ooka, J. J.; Miller, S. A.; Madden, L. V.; Hoitink, H. A. J. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against Phytophthora crown rot and leaf blight. **Plant Disease**, v. 88, p. 280-286, 2004.

Kleifeld, O.; Chet, I. *Trichoderma*: plant interaction and its effects on increased growth response. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 144, n. 2, p. 267-272, 1992.

Krause, M. S.; De Ceuster, T. J. J.; Tiquia, S. M.; Michel, F. C.; Jr.; Madden, L. V.;

Hoitink, H. A. J. Isolation and characterization of rhizobacteria from composts that suppress the severity of bacterial leaf spot of radish. **Phytopathology**, v.93, p.1292-1300, 2003.

Krügener, T. L.; Bacchi, L. M. A. Fungos. In: Bergamim Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, v.1, 1995.

Leandro L. F. S.; Guzman, T.; Ferguson, L. M.; Fernandez, G. E.; Louws, F. J. Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compost-amended soil and on strawberry roots. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p.237-246, 2007.

Lewis, J. A.; Papavizas, G. C. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. **Phytopathology**, v. 74, n.10, p. 1240-1244, 1984.

Lifshitz, R., Windham, M. T.; Baker, R. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.76, p.720-725, 1986.

Lumsden, R. D.; Lewis, J. A.; Millner, P. D. Effect of composted Sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. **Phytopathology**, v. 73, n. 11, 1983.

Lumsden, R. D.; Locke, J. C. Biological control of damping off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. **Phytopathology**, v. 79, p. 361-366, 1989.

Lynck, J. Pesquisa inglesa com agentes biológicos. **Jornal Agroceres**, São Paulo, v. 212, p. 2, 1992.

Martins-Corder, M. P.; Melo, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.1, p.1-7, 1998.

Melo, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de

doenças de plantas. In: Bettiol, W. (org). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPD, p. 135-156, 1991.

Melo, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patógenos de Plantas**, v. 4, p. 261-295, 1996.

Melo, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, EMBRAPA, p. 17-66, 1998.

Miller, F. C. Composting as a process based on the control of ecologically selective factors. In: **Soil Microbial Ecology**, p. 515-536, 1993.

Noble, R. E.; Coventry. Supression of soil-borne plant diseases with composts: a review. **Biocontrol Sci. Techonol.** v. 15, p. 3-20, 2005.

Papavizas, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, v. 23, p. 23-54, 1985.

Purdy, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, v. 69, p. 875-880, 1979.

Resende, M. L.; Oliveira, J. A.; Guimarães, R. M.; Pinho, R. G. V.; Vieira, A. R. Utilização de sementes de milho utilizando *Trichoderma harzianum* como promotor do crescimento. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 28, n. 4, 2004.

Samuels, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, p. 195-206, 2006.

Sanogo, S.; Pomella, A.; Hebbar, P. K.; Bailey, B.; Costa, J. C. B.; Samuels, G. J.; Lumsden, R. D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis perniciosus* on cacao. **Phytopathology**, v. 92, p. 1032-1037, 2002.

Schafer, M.; Kotanen, P. M. The influence of soil moisture on losses of buried seeds to fungi. **Acta Oecologica**, v. 24,

p. 255-263, 2003.

Sid Ahmed, A.; Pérez Sánchez, C.; Candela, M. E. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. **Eur. J. Plant Pathol.** v. 106, p. 817-824, 2000.

Silva, G. M.; Maia, M. S.; Moraes, C. O. C.; Medeiros, R. B.; Silva, C. S.; Pereira, D. D. Fungos associados a sementes de cevadilha vacariana (*Bromus auleticus*) coletadas nas plantas e no solo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 353-357, 2007.

Spiegel, Y.; Chet, I. Evolution of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Review**, v. 3, p. 167-175, 1998.

Stratton, M. L.; Barker, A. V.; Recheigl, J. E. Compost. In: Hornby, D.; Bateman, G. L. **Biological Indicators of Soil Health**, cap. 7, 1997.

Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, E. L.; Marra, R.; Woo, S. L.; Lorito, M. *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.

Zhang, W.; Dick, W. A.; Hoitink, H. A. J. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. **Phytopathology**, v. 86, p. 1066-1070, 1996.

CAPÍTULO II. Isolamento de *Trichoderma* spp. de resíduos compostados

Resumo

Conhecer a dinâmica de populações de *Trichoderma* spp. em ambientes naturais possibilita elucidar suas interações com patógenos e plantas. Alguns métodos para detecção de *Trichoderma* spp. são considerados rudimentares e insatisfatórios e outros, como os métodos moleculares, demandam um alto custo de investimento, nem sempre disponíveis em muitos projetos de pesquisa. O presente trabalho teve como objetivo comparar três métodos de isolamento de *Trichoderma* spp. de composto de resíduos orgânicos, com dois anos de maturação. Três amostras de 1,5 kg cada uma, foram retiradas do composto maturo e submetidas a três métodos de isolamento de *Trichoderma*: método de iscas, diluição em série de soluções de solo e plaqueamento direto de fragmentos do composto. O método de iscas não foi eficiente para a recuperação de *Trichoderma* spp. Tanto na diluição em série como no plaqueamento direto a presença de *Trichoderma* spp. foi constatada em duas das três amostras de composto. No plaqueamento direto, a visualização das colônias de *Trichoderma* spp. foi mais rápida comparada com a diluição em série, tornando-se o método mais recomendado para os estudos com compostos orgânicos.

Abstract

Population dynamics of *Trichoderma* in natural environments should be studied to understand the interactions between pathogens and plants. Some detection methods are laborious and unsatisfactory, while other methods, such as molecular identification of DNA, require large investments, not always available in research projects. This study sought to compare three methods of isolating *Trichoderma* spp. from organic compost that had matured for two years. Three samples of 1.5 kg were removed from mature compost, and subjected to three isolation methods with selective media: a baiting method, serial dilution of soil solution, and direct plating of compost fragments. The baiting method had no success in recovering *Trichoderma*. Both the serial dilution and the direct plating methods recovered *Trichoderma* in two of the three compost samples. The direct plating method was faster in detection of colony growth than the dilution method, making it the most practical method to be used when for these studies with organic compost

1. Introdução

Trichoderma spp. é um fungo pertencente à comunidade microbiana do solo, que apresenta grande importância na decomposição da matéria orgânica, na promoção do crescimento de plantas, na germinação de sementes bem como no controle de fungos fitopatogênicos. Espécies deste gênero já foram documentadas em matéria orgânica compostada (Hoitink & Kuter, 1986; Hoitink & Boehm, 1999; Pugliese *et al.*, 2008), podendo ser uma explicação da ação supressora do composto a fitopatógenos. Tendo em vista a importância ecológica de *Trichoderma* spp., é valoroso compreender a atividade destes microrganismos nos agroecossistemas.

O conhecimento da dinâmica de populações de *Trichoderma* no solo e suas interações com patógenos e plantas estão em plena construção. Contudo, alguns métodos para detecção de *Trichoderma* spp. em ambientes naturais são considerados rudimentares e insatisfatórios, tornando o aprimoramento deste conhecimento um verdadeiro desafio. Segundo Thornton e colaboradores (2002), estudos da interação entre fungos hiperparasitas e seus hospedeiros são dificultados devido a ausência de métodos de rápida detecção e visualização de propágulos *Trichoderma* spp. em complexos ambientes, que contêm uma diversificada população de fungos semelhantes em solo ou composto.

Atualmente, métodos moleculares como PCR, são desenvolvidos para identificar *Trichoderma* em seus ambientes naturais (Woo *et al.*, 2006). Porém, apesar da eficiência, esses são métodos que demandam um alto custo de investimento, o qual nem sempre é viável.

Apesar dos desafios, de acordo com Melo (1991), considerando o potencial supressivo de *Trichoderma* spp., é necessário intensificar o isolamento e a seleção de

microrganismos com capacidades antagônicas. A partir desses achados, novas espécies poderão ser encontradas e mais processos desvendados, tornando possível, mesmo que minimamente, compreender a origem da ação supressora do composto e do importante sistema biológico neste meio.

O presente trabalho teve como objetivo comparar três métodos de isolamento de *Trichoderma* spp. de compostos de resíduos orgânicos.

2. Material e Métodos

2.1 Fontes de *Trichoderma* spp.

Foram utilizadas amostras de composto, processado artesanalmente no pátio de compostagem da UFSC (27°35'50" Sul; 48°30'55" Oeste) (Figura 1), Laboratório de Biotecnologia Neolítica – Florianópolis/SC. A matéria-prima para a produção do composto é constituída basicamente por cascas de frutas, restos vegetais e sobras de refeições oriundas de coleta seletiva em restaurantes e supermercados, caracterizados como grandes geradores de resíduos orgânicos. Resíduos vegetais de poda e capina, e maravalha de *Pinus* utilizados para criação de roedores em laboratórios de pesquisa formam as camadas que proporcionam arejamento contínuo ao processo.

Três amostras (A, B e C) de 1,5 kg cada uma, foram retiradas de partes diferentes da pilha de composto com dois anos de maturação. As amostras foram submetidas a três métodos para isolamento de *Trichoderma*: método de iscas, diluição em série e plaqueamento direto. Para todos os métodos, foi utilizado meio seletivo para *Trichoderma* modificado (Papavizas & Lumsden, 1982): 200ml de suco V-8, 800ml de água destilada, 20g de ágar, 1g de glicose, 100mg de penicilina, 100mg de clorofenicol e 100mg de rifampicina.

2.2 Método de iscas

Das três amostras do composto, constituídas por duas repetições cada uma, 500g foram colocadas em garrafas Pet. Nas mesmas foram introduzidas, numa altura de 10 cm de profundidade, trouxas feitas com gaze hidrófila (13 fios por cm², 7,5cm com quatro dobras) e barbante, contendo cinco escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* cada uma (patógeno cedido por Dr^a. Raquel Guini da Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna

– SP). Em cada recipiente o material compostado, foi umedecido com 10 ml de água destilada e esterilizada e coberto com papel alumínio. Em seguida, foi mantido em temperatura ambiente (com variação de 18 a 28°C), sem incidência direta de luz solar (Ghini & Kimath, 1989).



Figura 1. Pátio de compostagem da UFSC

A cada cinco dias, por 30 dias, os escleródios foram retirados das trouxas e imersos por cerca de 1 min, em álcool (70%), 30 segundos em hipoclorito de sódio (0,5%) e, posteriormente, imersos três vezes em água destilada e esterilizada, conforme Ethur *et al.* (2005). Em seguida foram deixados para secar sobre papel-filtro esterilizado e colocados em placas de Petri com meio seletivo para *Trichoderma* e incubadas por cinco dias em câmara climatizada a $24^{\circ}\text{C} \pm 2$, com fotoperíodo de 12 horas. As colônias com crescimento semelhante a *Trichoderma* spp. foram transferidas para placas de Petri com meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e, após sete dias de incubação, foram identificadas a nível de gênero, com base em bibliografia especializada (Barnett &

Hunter, 1998).

2.3 Diluição em série

De cada amostra do composto, foram retiradas 10 g e colocadas em frascos de erlenmeyer com 100 ml de água destilada. As soluções foram submetidas a agitação, por três minutos, em agitador mecânico. Em seguida, foi preparado diluições em série 10^{-2} e 10^{-3} a partir da suspensão do interior do frasco. Das diluições, alíquotas de 0,1 ml foram pipetadas em placas de Petri (Moreira & Siqueira, 2002), contendo meio seletivo para *Trichoderma* e espalhadas com o auxílio da alça de Drigalsky, com quatro repetições para cada diluição.

2.4 Plaqueamento direto

Cinco fragmentos de cada amostra de composto, de aproximadamente 2 mm de diâmetro, foram plaqueados diretamente em placas de Petri contendo meio seletivo para *Trichoderma*. Para cada amostra quatro placas foram utilizadas.

Para os dois últimos tratamentos, as culturas, em meio BDA, foram incubadas em câmara climatizada a $24^{\circ}\text{C} \pm 2$, com fotoperíodo de 12 horas e após cinco dias, contou-se o número de placas, com colônias de crescimento semelhante a *Trichoderma* spp. Para essas colônias, foram adotados os procedimentos conforme o primeiro tratamento.

3. Resultados

A partir do método de iscas não foi observado a presença de *Trichoderma* sp. em nenhuma das amostras. Contudo, foi identificado, a partir do 10º dia de incubação, a presença de *Penicillium* sp. Os escleródios de *S. sclerotiorum* se desenvolveram sem, aparentemente, nenhuma interferência, podendo indicar a ausência de controlador biológico.

Na diluição em série, a presença de *Trichoderma* sp. foi constatada em duas das três amostras de composto. O aparecimento das colônias desse fungo só pôde ser visualizado a partir do 5º dia de observação. Desde então, foi notada o crescimento de uma variedade de microrganismos, a partir da observação das diferentes colorações das colônias (Tabela 2). Nas placas com concentrações de 16.10^2 UFC/g de composto B e 23.10^2 UFC/g de composto C, menos de 10% dos microrganismos observados, equivalem à colônias de *Trichoderma* spp. Além de *Trichoderma*, estirpes de *Penicillium* e *Aspergillus* foram identificadas.

No plaqueamento direto do composto, em duas amostras do composto (B e C), *Thichoderma* sp. foi facilmente identificado devido a presença de conídios verdes pulverulentos e colônias de crescimento rápido (Figura 2). A partir do terceiro dia de observação, as placas se encontravam parcialmente cobertas pelo micélio do fungo. Uma menor variedade de colônias com diferentes colorações foi observada (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de placas com *Trichoderma* spp., e variedade de fungos determinada pelas unidades formadoras de colônias (UFC) e coloração das mesmas, nos três métodos de isolamento.

Amostras	Método de iscas	Diluição em série (10^{-2})			Plaqueamento direto	
		Nº de placas C/Tricho	UFC/g composto	Coloração	Nº de placas C/Tricho	Nº de placas C/Tricho
A	0		30×10^2	4	0	2
B	0		16×10^2	2	3	1
C	0		23×10^2	4	3	3

Método de iscas: duas repetições por amostra; Diluição em série e Plaqueamento direto: três repetições por amostra.

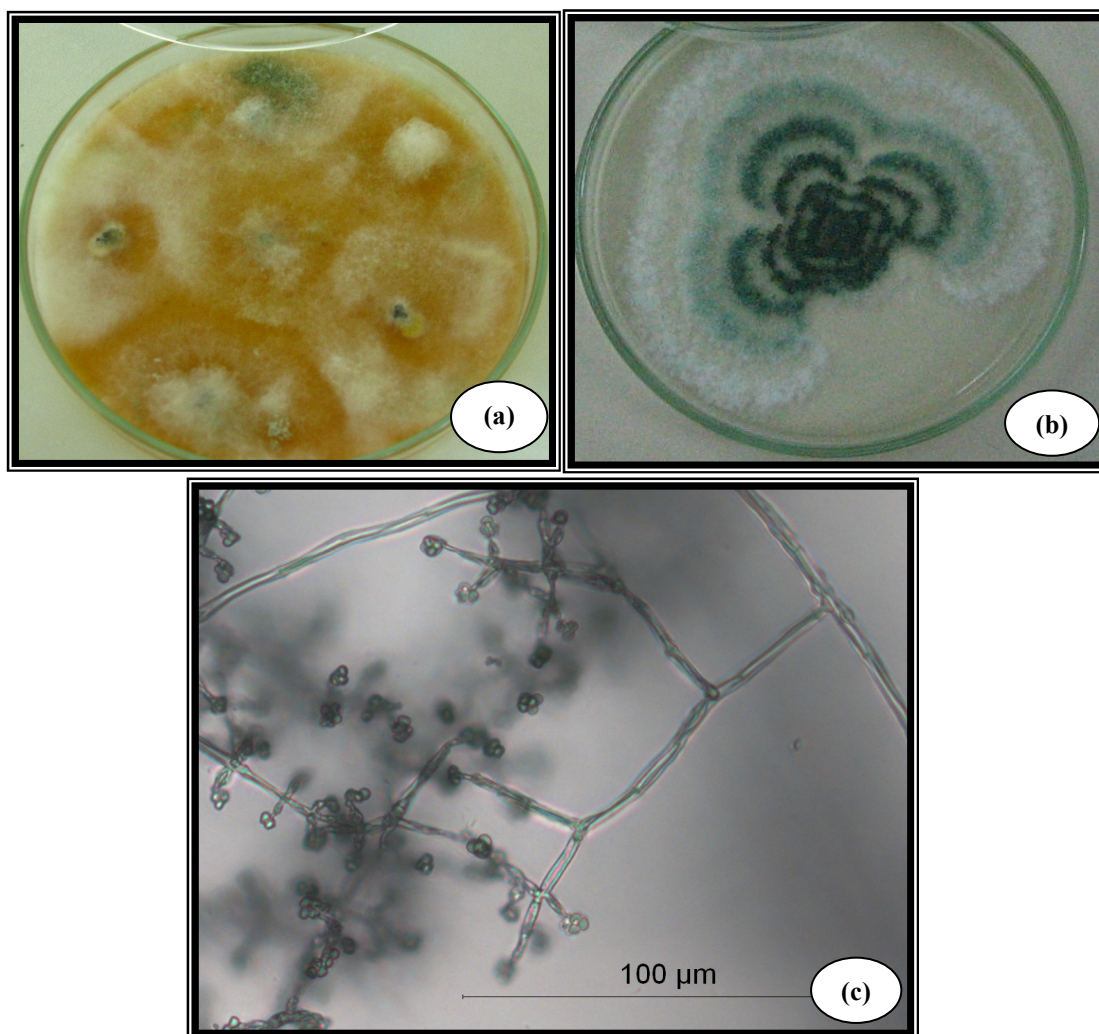


Figura 2. (a) Plaqueamento direto, (b) colônia de *Trichoderma* sp. isolado por plaqueamento direto, (c) aspecto morfológico do isolado.

4. Discussão

A ausência de *Trichoderma* sp. nas estruturas dos escleródios pode ter sido influenciada pelas propriedades físico-químicas do composto, já que o método de iscas foi proposto para o isolamento de fungos do solo e não de compostagem. Além disso, *Trichoderma* sp. presente nas pilhas de compostagem pode apresentar uma produção insuficiente de enzimas responsáveis pela degradação da parede dos propágulos, por serem sensíveis a quaisquer alterações no meio. Ao contrário deste trabalho, Ethur e colaboradores (2005) conseguiram isolar do solo, a partir de escleródios de *S. sclerotiorum*, fungos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*. Patrício *et al.* (2001) também obtiveram sucesso com o método, obtendo do solo, 31 isolados de *Trichoderma* spp.

Na diluição em série, método comum para o isolamento de microrganismos do solo, *Trichoderma* spp. foi identificado. Contudo, exigiu para seu isolamento, maior cautela devido à variedade de colônias no meio, que rapidamente começaram a se sobrepor. No presente trabalho, o isolamento de *Trichoderma* spp. a partir da diluição em série, levou mais tempo para o desenvolvimento do fungo já que o mesmo pode ter se iniciado da germinação de esporos. No plaqueamento direto, a introdução de fragmentos de composto pode ter favorecido o crescimento de *Trichoderma* spp. a partir de hifas, acelerando o domínio do fungo na placa e evitando a sobreposição de colônias de espécies de outro gênero. A presença de hifas ativas evidenciadas pelo plaqueamento direto compensa a baixa presença de esporos demonstrados pelo método de diluição em série.

O composto envelhecido apresenta condições estáveis, como umidade, temperatura, pH e recursos nutricionais, para o estabelecimento de populações de

fungos com potencial supressor (Howard, 2007; Hoitink & Fahy, 1986). Os esporos são estruturas produzidas principalmente, segundo alguns autores (Beagle-Ristaino & Papavizas, 1985; Danielson & Davey, 1973), em condições desfavoráveis ao crescimento do fungo. Sendo assim, o plaqueamento direto se torna uma alternativa aos demais métodos utilizados no presente trabalho, para o isolamento de *Trichoderma* spp. por se tratar de um ambiente onde a produção de esporos não é primordial.

5. Conclusão

Constatou-se a presença de *Trichoderma* spp. em matéria orgânica compostada.

O isolamento foi possível a partir de métodos simples e de baixo custo, como o plaqueamento direto de fragmentos do composto.

O plaqueamento direto foi considerado o método de isolamento mais apropriado para os estudos com compostagem de resíduos orgânicos.

6. Referências Bibliográficas

Barnett, H.L.; Hunter, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. 3°. **Minnesota: Burgess Publishing Company**, 218p., 1998.

Beagle-Ristaino, J. E.; Papavizas, G. C. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. **Phytopathology**, v. 75, p. 729-732, 1985.

Danielson, R. M.; Davey, C. B. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. **Soil Biol. Biochem.** v. 5, p. 495-504, 1973.

Ethur, L. Z.; Blume, E.; Muniz, M.; Silva, A. C. F.; Stefanelo, D. R.; Rocha, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

Ghini, R.; Kimath, H. **Método de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagonísticos a *Botrytis cinerea***. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA, 1989.

Hoitink, H. A. J.; Boehm, M. J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. **Annual Review Phytopathology**. v. 37, p. 427-446, 1999.

Hoitink, H. A. J.; Fahy, P. C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. **Ann. Rev. Phytopathology**, v. 24, p. 93-114, 1986.

Hoitink, H. A. J.; Kuter, G. A. Effects of composts is growth media on soilborne pathogens. In: Chen, Y.; Avnimelech, Y. (Ed.). **The role of organic matter in modern agriculture**. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht – Boston – Lancaster, 1986.

Howard, S. A. **Um testamento agrícola**. Tradução de Eli Lino de Jesus. Apresentação, revisão técnica e notas de rodapé de Luiz Carlos Pinheiro Machado. São Paulo: Expressão Popular, 360p., 2007. Traduzido da edição especial da Rodali Press, USA,

1976.

Melo, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (org). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPD, p. 135-156, 1991.

Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Ed. UFLA, 625p., 2002.

Papavizas, G. C.; Lumsden, R. D. Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. **Plant Disease**, v. 66, p. 1019-1020, 1982.

Patrício, F. R. A.; Kimati, H.; Barros, B. C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonicos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 223-229, 2001.

Pugliese, M.; Liu, B. P.; Gullino, M. L.; Garibaldi, A. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 115, n. 5, p. 220-228, 2008.

Thornton, C. R.; Pitt, D.; Wakley, G. E.; Talbot, N. J. Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its used to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested compost. **Microbiology**, v. 148, p. 1263-1279, 2002.

Woo, S. L.; Scala, F.; Ruocco, M.; Lorito, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, v. 96, p. 181-185, 2006.

CAPÍTULO III. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos.

Resumo

Composto processado artesanalmente pode ser uma fonte de *Trichoderma* spp. O presente trabalho visou isolar *Trichoderma* spp. de composto de uma semana, um e dois anos de maturação e do solo, e verificar características úteis dos mesmos para o controle biológico de fitopatógenos. Oito isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos por plaqueamento direto e comparados a *Trichoderma* de formulação comercial (TC) quanto ao crescimento micelial e esporulação em BDA. Para avaliar o crescimento dos antagonistas frente a patógenos, inicialmente os 8 isolados e TC, foram confrontados com *Sclerotinia sclerotiorum*. Em seguida, apenas o isolado (M2) do composto de dois anos e o TC foram confrontados com *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. e *Fusarium solani*. O crescimento micelial dos isolados do composto e do solo foram semelhantes. Enquanto os isolados do composto de um ano apresentaram a maior esporulação, o isolado do composto de dois anos competiu melhor que TC frente aos patógenos. A competição por espaço e nutrientes foi um possível mecanismo de ação de biocontrole.

Abstract

Hand-crafted compost may be a useful source of *Trichoderma* spp. The present study sought to isolate *Trichoderma* from compost aged one week, compost aged one and two years, and from nearby forest soil. Isolates were tested for characteristics useful in the control of plant pathogens. Eight isolates were obtained by directly plating compost and soil fragments onto selective growth media. These were then compared to a commercial strain of *Trichoderma* for mycelial growth and sporulation on potato-dextrose agar, first in sole culture, and then in confrontation with *Sclerotinia sclerotiorum*. One isolate from mature compost was then confronted with *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium solani*. Mycelial growth rates of compost from compost and soil were similar, and greater than growth of the commercial strain. Strains from one year old compost had the greatest rate of sporulation, and the strain from two-year old compost competed better against pathogens than the commercial strain. Competition for space and nutrients may be an important mechanism for biocontrol of soil-borne plant pathogens

1. Introdução

A compostagem é um processo de aproveitamento e transformação de resíduos orgânicos a uma forma de matéria mais estável e útil para o solo. Envolve uma grande diversidade de microrganismos que são alterados conforme as características do meio, no decorrer do processo (Epstein, 1997). O composto apresenta características importantes que podem beneficiar o solo, sustentando e recompondo sua fertilidade, tanto em aspectos quantitativos como qualitativos (Howard, 2007).

Estudos apontam o composto como um meio naturalmente supressivo a fitopatógenos (Craft & Nelson, 1996; Hoitink & Boehm, 1999; Noble & Coventry, 2005; Howard, 2007). A idade do material compostado pode estar vinculada a sua ação supressora (Hoitink & Kuter, 1986; Chung & Hoitink, 1990; Epstein, 1997), por isso o composto mais antigo oferece condições que favorecem o restabelecimento de uma comunidade microbiana semelhante ao do solo, por apresentar características semelhantes ao mesmo (Howard, 2007). Recentemente, microrganismos de composto, entre eles *Trichoderma* spp., foram selecionados e testados quanto a ação antagônica a *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora nicotianae* (Pugliese *et al.* 2008).

Trichoderma sp é um fungo de solo, com características de grande interesse para agricultura. Espécies desse gênero podem beneficiar a germinação de sementes e o crescimento, assim como induzir resistência sistêmica em plantas (Melo, 1991; Howell *et al.*, 2000; Harman *et al.*, 2004). *Trichoderma* spp. também apresentam eficácia conhecida no controle de fungos causadores de doenças em plantas de interesse econômico. Seu efeito antagônico é conhecido para uma variedade de patógenos, estando entre eles *Rhizoctonia* sp., *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Melo,

1991).

Muitos estudos mostram a ação supressora de *Trichoderma* spp. e do composto. Contudo, poucos correlacionam a ação supressora do composto à presença de *Trichoderma* spp. no meio (Hoitink & Kuter, 1986; Chung & Hoitink, 1990). Para elucidar a dinâmica de *Trichoderma* em composto é necessário conhecer as espécies e o potencial desses agentes presentes no meio. Neste sentido, seria possível considerar o composto como um sistema biológico benéfico à agricultura, tornando-se uma alternativa de baixo custo para o controle de doenças de plantas.

O presente trabalho teve como objetivo isolar *Trichoderma* spp. de pilhas de composto com diferentes estágios de maturação e testar a atividade dos mesmos frente aos patógenos de solo: *Rhizoctonia* sp., *Fusarium solani* e *Sclerotinia Sclerotiorum*.

2. Material e Métodos

2.1 Fontes de *Trichoderma* spp.

Foram utilizadas amostras de composto processado artesanalmente no pátio de compostagem da UFSC (27°35'50" Sul; 48°30'55" Oeste), Laboratório de Biotecnologia Neolítica – Florianópolis/SC. Além do composto, utilizou-se amostras de solo proveniente de uma mata adjacente ao pátio de compostagem e de uma formulação comercial de *Trichoderma* – Agrotich® (Empresa Agrosafra Sementes – Santa Cruz do Sul/RS). As amostras de composto foram retiradas de leiras com diferentes estágios de maturação: uma semana, um ano e dois anos (Figura 3). Três subamostras, retiradas de partes distintas das leiras e do solo, compuseram uma amostra composta totalizando três quilogramas por tratamento. Antes do isolamento de *Trichoderma* spp., as amostras foram deixadas em repouso por quatro dias sem a incidência direta de luz solar.

2.2 Isolamento de *Trichoderma* spp. por plaqueamento direto

Fragmentos de cada amostra foram transferidos para placas de Petri pelo método de plaqueamento direto, com três repetições por amostra. Cinco fragmentos de aproximadamente 2 mm de diâmetro foram depositados diretamente em cada placa de Petri, contendo meio seletivo para *Trichoderma* modificado (Papavizas & Lumsden, 1982): 200 ml de suco V-8, 800 ml de água destilada, 20 g de ágar, 1 g de glicose, 100 mg de Penicilina, 100 mg de Clorofenicol e 100 mg de Rifampicina. As culturas foram incubadas em câmara climatizada a 24°C ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias, contou-se o número de placas por tratamento com colônias de crescimento semelhantes a *Trichoderma* spp. Para confirmação do gênero, as colônias foram transferidas para placas de Petri com meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e, após sete

dias de incubação, foram identificadas, com base em bibliografia especializada (Barnett & Hunter, 1998) e em seguida, encaminhados para *Universidad de la República*, Uruguay para identificação, sob supervisão da Dra. Silvana Vero. Os mesmos foram também depositados na Micoteca “Anne-Lore Schroeder” do Laboratório de Fitopatologia – CCA – UFSC.



Figura 3. (a) e (b) Pilhas de compostagem; (c) composto com dois anos de maturação.

2.3 Crescimento e esporulação *in vitro* de diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Oito isolados de *Trichoderma* spp., obtidos do teste descrito anteriormente, foram comparados quanto ao crescimento micelial e produção de conídios, com um isolado de *Trichoderma* da formulação comercial (Agrotrich[®]), preparado a partir da germinação dos conídios, em BDA, por sete dias.

Para avaliar o crescimento micelial, discos (5 mm Ø) de cultura miceliada destes isolados, crescidos em BDA por sete dias, foram transferidos para junto das bordas de placas de Petri (90 mm Ø) também contendo BDA. Estas foram incubadas em câmara climatizada de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. O crescimento micelial foi avaliado após cinco dias de incubação. Com o auxílio de um paquímetro, mediu-se em um único sentido, o maior comprimento da colônia, partindo do disco de cultura.

Para avaliar a produção de conídios, foram adicionados 10 ml de água destilada por placa de Petri, contendo os isolados crescidos em meio BDA por cinco dias. Com o auxílio de uma espátula de Drigalski, o meio contendo a cultura miceliada e esporulada, foi levemente raspado e agitado para que houvesse o desprendimento dos esporos. A suspensão obtida foi filtrada em gaze dupla e a concentração dos esporos foi determinada com o auxílio de uma câmara de contagem de Neubauer.

Utilizou-se para ambos os testes, o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 1% para a comparação de médias.

2.4 Confrontação direta

Para verificar a interação entre patógeno e antagonistas, os nove isolados de *Trichoderma* spp., utilizados na avaliação anterior, foram testados e comparados no método de confrontação direta (Bell *et al.*, 1982; Silva, 1997; Ethur *et al.*, 2005). Os

antagonistas foram colocados frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, patógeno cedido pela Dr^a. Raquel Guini da Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna – SP e depositado na Micoteca “Anne-Lore Schroeder” sob o código MANE2. Discos de BDA com cultura miceliada de *S. sclerotiorum* e dos isolados de *Trichoderma* spp. foram colocados em lados opostos, próximos às bordas das placas de Petri. As colônias foram incubadas em câmara climatizada a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e em fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias mediuse o crescimento micelial das colônias dos antagonistas, partindo do disco de cultura e realizada a avaliação de acordo com os critérios propostos por Bell *et al.* (1982) com escalas de notas variando de 1 a 5, sendo 1 (antagonista cresce por toda a placa de Petri), 2 (antagonista cresce sobre 2/3 da placa), 3 (antagonista e patógeno crescem até a metade da placa), 4 (patógeno cresce sobre 2/3 da placa) e 5 (patógeno cresce por toda a placa de Petri).

Para uma segunda avaliação, foram selecionados dois isolados de *Trichoderma* spp.: um da pilha de dois anos de maturação e o de origem comercial (Agrotich[®]) e, além de *S. sclerotiorum*, foram testados dois outros patógenos: *Rhizoctonia* – MANE66 e *Fusarium solani* – MANE59, recuperados da Micoteca “Anne-Lore Schroeder” – CCA – UFSC.

Todos os tratamentos foram conduzidos em triplicata com delineamento inteiramente casualizado. Os resultados obtidos na primeira avaliação foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 1% para comparação de médias. Para a segunda avaliação as médias dos resultados foram comparadas a partir do teste-T.

3. Resultados

3.1 Isolamento de *Trichoderma* spp. por plaqueamento direto

Não foi constatada a presença de *Trichoderma* spp. em leiras de compostagem novas, de uma semana. Por outro lado, verificou-se a presença de *Trichoderma* spp. em pilhas de compostagem com estágio de maturação de um ano, dois anos e do solo. No composto de um e dois anos, *Trichoderma* spp. foi recuperado em todas as placas, enquanto que do solo, apenas em duas placas. Oito isolados foram selecionados a partir das placas com colônias de *Trichoderma* spp. (Tabela 3). Destes, M2 foi identificado como *Hypocrea lixii*, fase sexuada de *Trichoderma harzianum* e M1, juntamente com o isolado de origem comercial (TC), foram identificados como *Trichoderma asperellum*.

Tabela 3. Número de placas com colônias de *Trichoderma* spp., quantidade e identificação dos isolados.

Fontes de <i>Trichoderma</i>	Nº de placas c/ <i>Trichoderma</i> spp.*	Quantidade de isolados	Identificação**
Composto de 1 semana	0	0	0
Composto de 1 ano	3	3	N1, N2, N3
Composto de 2 anos	3	3	M1, M2, M3
Solo	2	2	S2, S3

*Três repetições por tratamento; **(N-composto novo, M-composto maturo, S-solo)

3.2 Crescimento e esporulação *in vitro* dos isolados de *Trichoderma* spp.

A partir da avaliação do desenvolvimento *in vitro* dos isolados, verificou-se uma variação no desenvolvimento micelial e na produção de conídios (Figura 4). O crescimento micelial de isolados do solo quando comparado com isolados do composto de um e dois anos, não apresentou diferença estatística pela ANOVA. Já o isolado comercial foi estatisticamente diferente tanto dos isolados do composto de um e dois anos, como dos isolados do solo. A maior concentração de conídios foi verificada nos isolados de composto de um ano, que diferiram estatisticamente pela ANOVA dos isolados do solo e comercial e não diferiram dos isolados do composto de dois anos. Já estes últimos, apresentaram semelhanças na concentração de conídios tanto em relação aos isolados do composto de um ano como dos isolados do solo e do comercial.

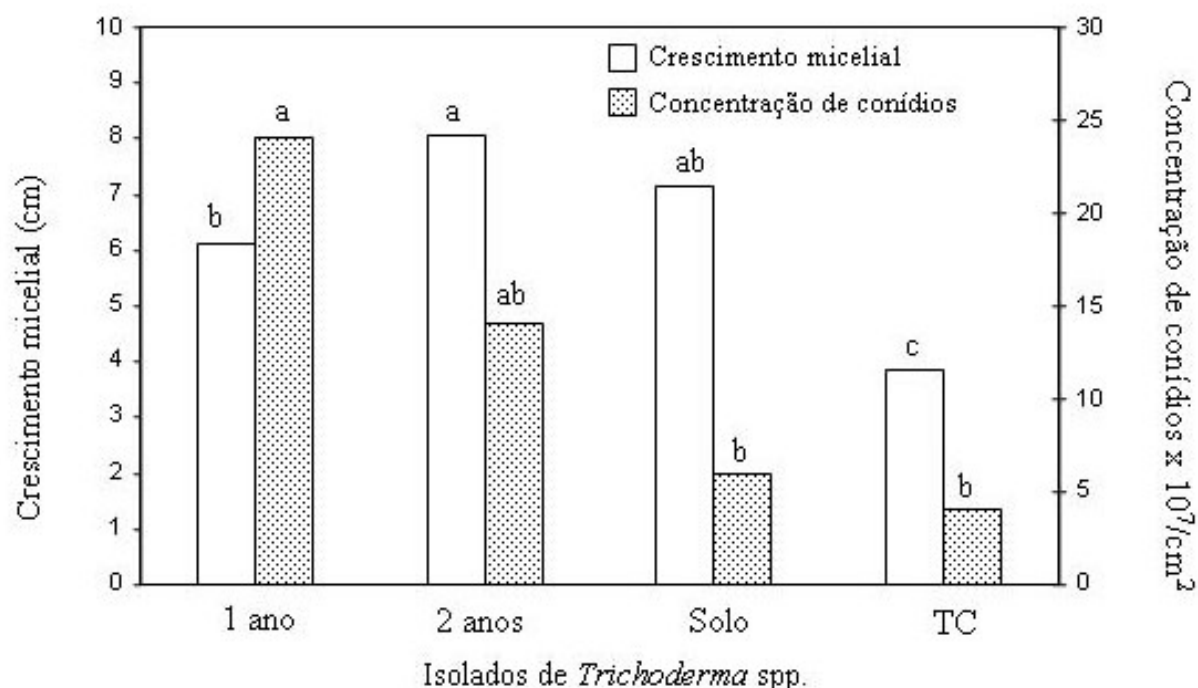


Figura 4. Crescimento micelial e concentração de conídios, em BDA, de isolados de *Trichoderma* spp. de material compostado por um e dois anos, do solo de uma floresta adjacente ao pátio de compostagem e de formulação comercial (TC). Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 1%.

3.3 Confrontação Direta

No primeiro teste de confrontação direta (Figura 5), os isolados M1 e M2, derivados de pilhas de composto de dois anos de maturação, receberam nota 2 na escala proposta por Bell *et al.* (1982), demonstrando, entre os isolados avaliados, o mais intenso efeito antagônico frente a *S. sclerotiorum*. O isolado TC, de origem comercial, recebeu nota 4. Este apresentou crescimento lento, o que facilitou o domínio do patógeno em placa de Petri. Os demais isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram ação antagônica a *S. sclerotiorum*, intermediária. Com exceção do isolado TC, todos os isolados colonizaram e produziram esporos em abundância sobre as colônias de *S. sclerotiorum*, o que não evitou a formação de escleródios pelo patógeno. Somente o isolado TC formou um pequeno halo de inibição, de aproximadamente 0,6 cm, evidenciando possivelmente, a produção de metabólitos que impediram o crescimento do patógeno.

No segundo teste (Figura 6), o isolado M2, comparado ao isolado TC, apresentou melhor desempenho no controle de *Rhizoctonia* sp., *Fusarium solani* e *S. sclerotiorum* devido, principalmente, à rápida colonização do meio (Figura 7). Para *S. sclerotiorum*, os isolados de *Trichoderma* spp. encontraram maior dificuldade no domínio do meio já que o patógeno também apresenta acelerado desenvolvimento, tornando-se um importante competidor por espaço, principalmente quando confrontado com o isolado TC, que possui crescimento mais lento. Verificou-se a formação de halo de inibição no confronto entre o isolado TC e *S. sclerotiorum* (Figura 8). Nenhum dos dois isolados de *Trichoderma* spp., impediu a formação de escleródios de *S. sclerotiorum*.

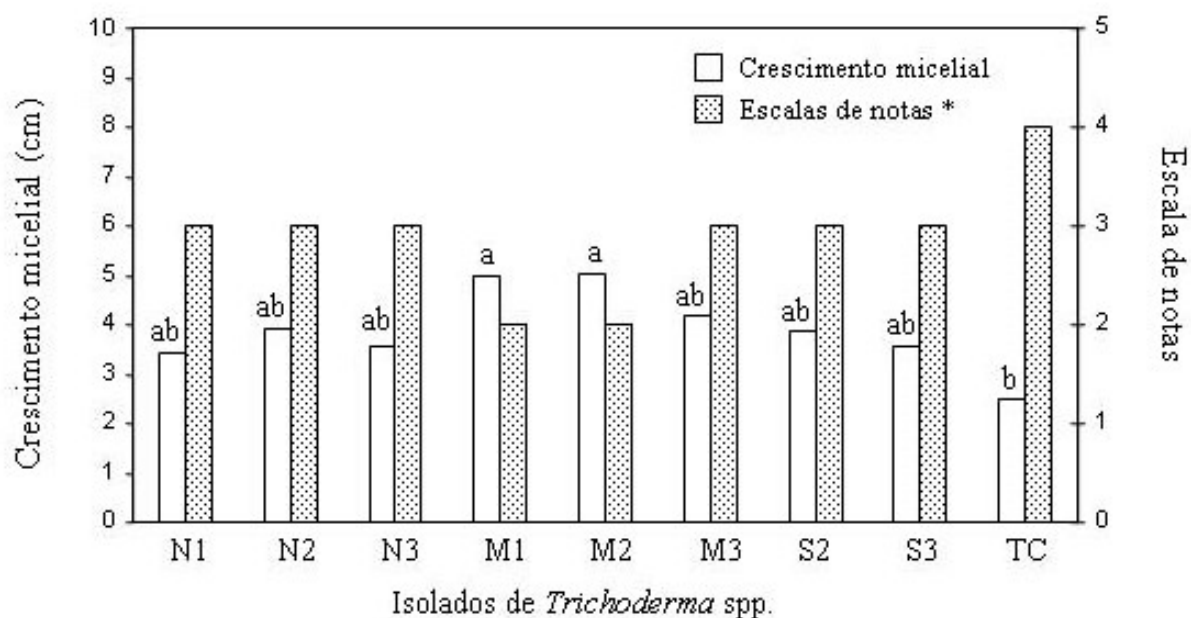


Figura 5. Crescimento micelial e escala de notas dos isolados de *Trichoderma* spp. derivados de pilhas de composto (N1, N2, N3 – composto 1 ano; M1, M2, M3 – composto 2 anos), solo (S2 e S3) e de origem comercial (TC – *Trichoderma* comercial) frente a *S. sclerotiorum*. *1 (antagonista cresce por toda a placa de Petri), 2 (antagonista cresce sobre 2/3 da placa), 3 (antagonista e patógeno crescem até a metade da placa), 4 (patógeno cresce sobre 2/3 da placa) e 5 (patógeno cresce por toda a placa de Petri). Nas colunas, letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 1%.

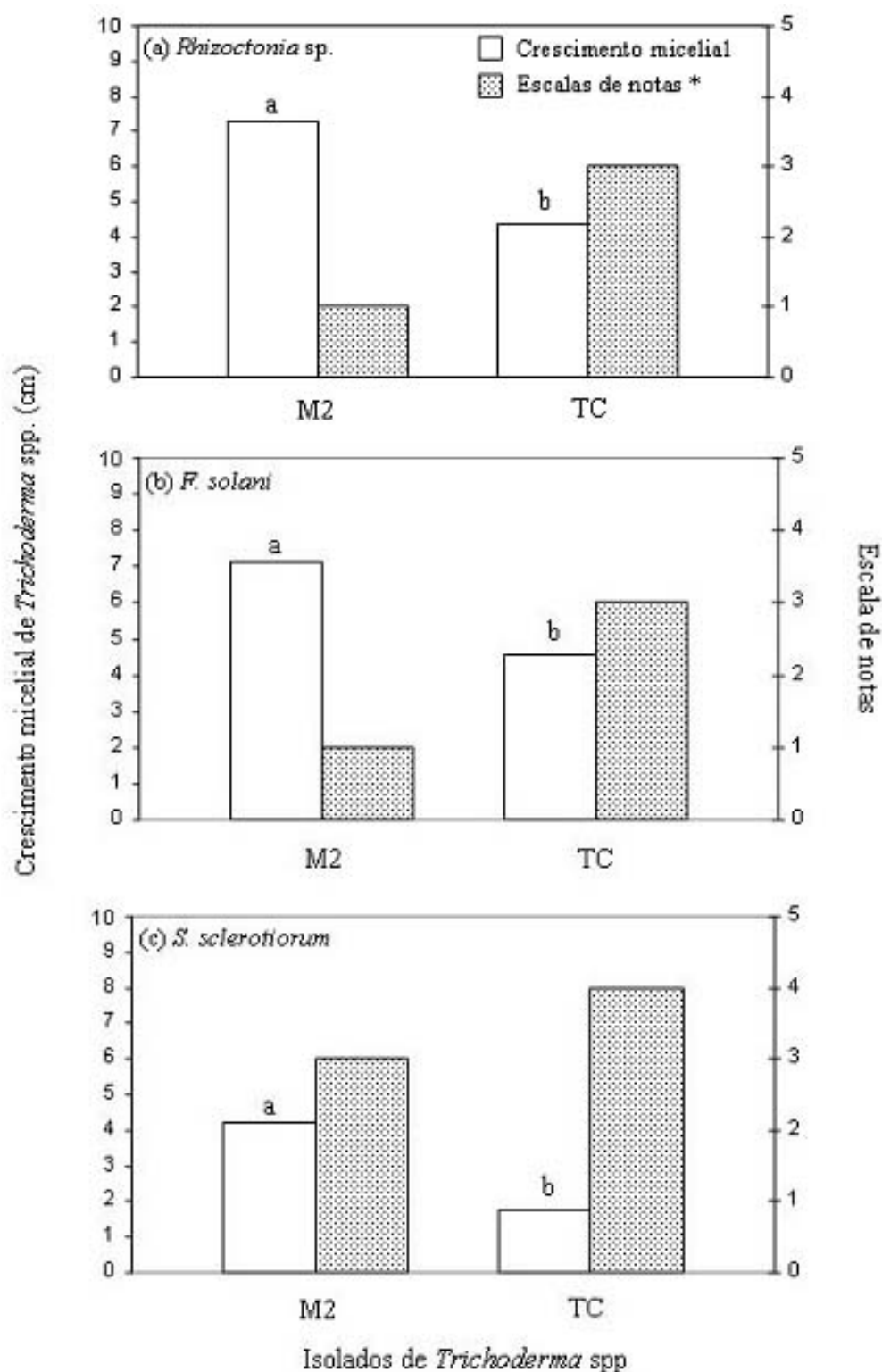


Figura 6. Crescimento micelial e escala de notas dos isolados de *Trichoderma* spp. M2 e TC, na presença de (a) *Rhizoctonia* sp., (b) *F. solani* e (c) *S. sclerotiorum*. Nas colunas, letras diferentes indicam que as médias diferiram significativamente segundo teste-T. *1 (antagonista cresce por toda a placa de Petri), 2 (antagonista cresce sobre 2/3 da placa), 3 (antagonista e patógeno crescem até a metade da placa), 4 (patógeno cresce sobre 2/3 da placa) e 5 (patógeno cresce por toda a placa de Petri).

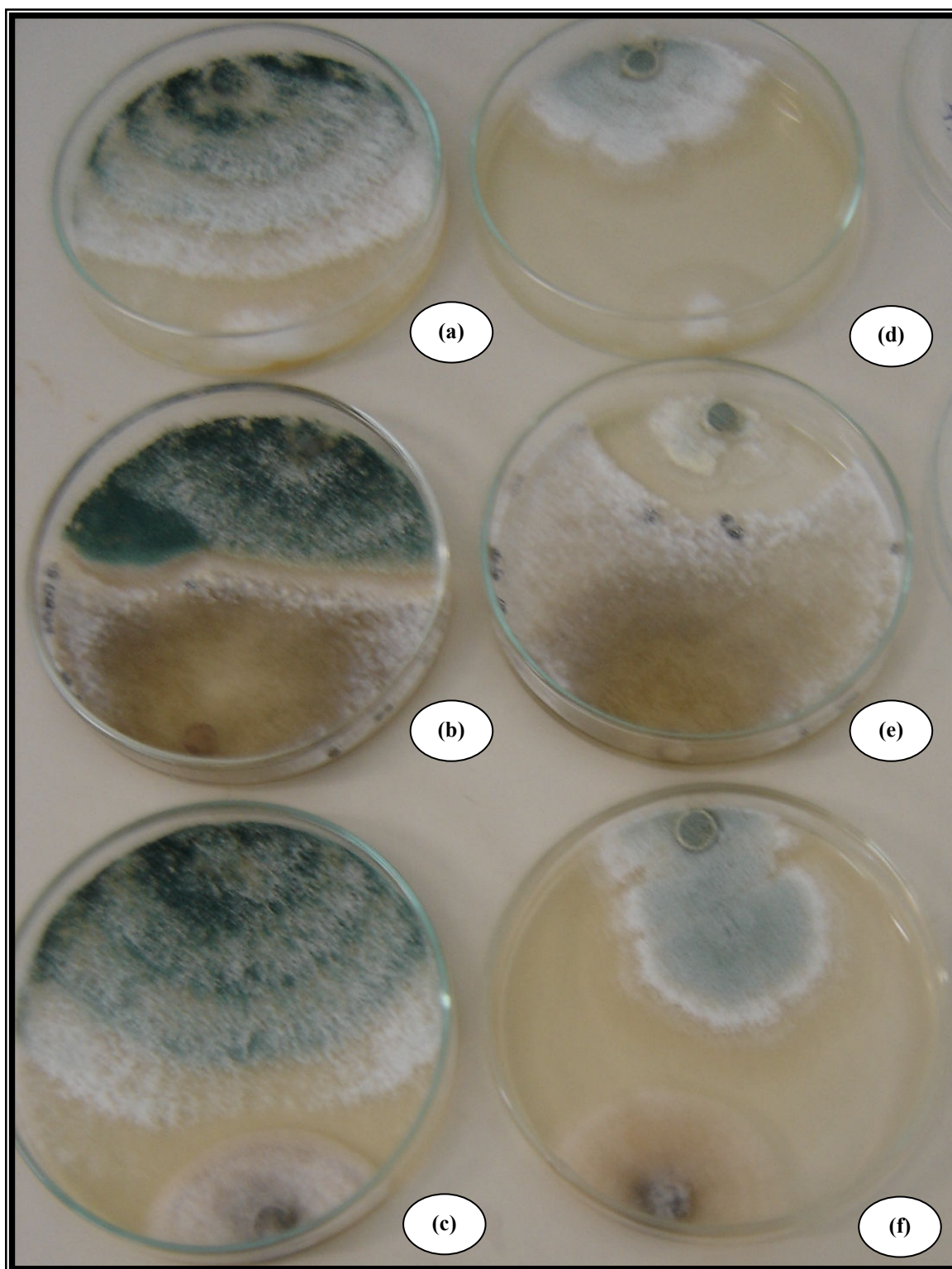


Figura 7. Isolado M2 frente a: (a) *F. solani*, (b) *S. sclerotiorum*, (c) *Rhizoctonia* sp. e isolado TC frente a: (d) *F. solani*, (e) *S. sclerotiorum*, (f) *Rhizoctonia* sp. Antagonistas na parte superior das placas de Petri e patógenos na parte inferior.

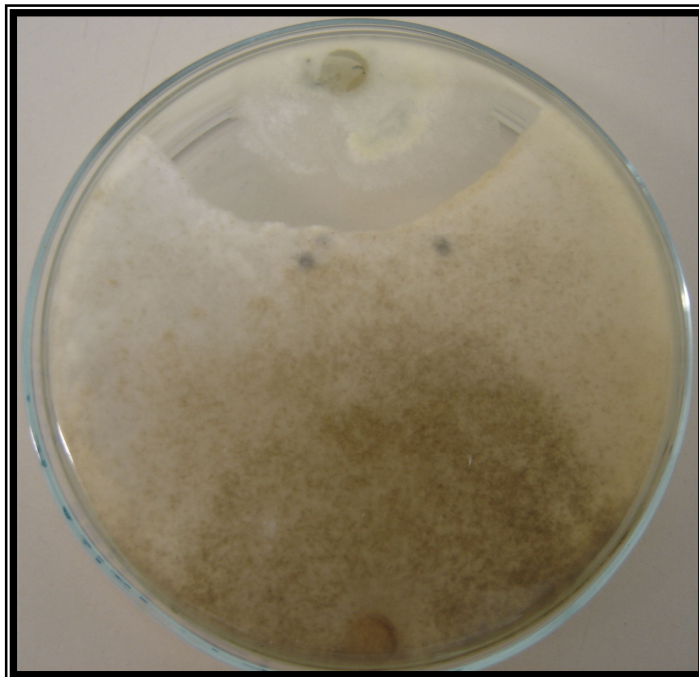


Figura 8. Halo de inibição no confronto entre o isolado TC e *S. sclerotiorum*. Antagonista na parte superior da placa de Petri e patógeno na parte inferior.

4. Discussão

4.1 Isolamento de *Trichoderma* spp. por plaqueamento direto

A ausência de *Trichoderma* no substrato de uma semana, bem como sua presença nos demais compostos amostrados, pode estar relacionada à idade da matéria orgânica compostada, bem como da composição química do composto (Hoitink & Fahy, 1986; Chung & Hoitink, 1990, Hoitink & Kuter 1986). O material em início de processo, a 60°C, pode conter toxinas e ácidos fenólicos, derivados da atividade anaeróbica, capazes de interferir na atividade de microrganismos supressivos (Stratton *et al.*, 1997). Segundo Hoitink e Fahy (1986), a maioria dos microrganismos com atividade supressora, presentes no composto, recolonizam as pilhas nas camadas externas, com baixa temperatura, após a fase termofílica da compostagem, em que a temperatura do composto chega a 60-70°C, e a maioria dos patógenos e microrganismos benéficos são eliminados.

Logo, o composto processado há mais tempo apresenta uma composição microbiológica mais equilibrada e estável, com predomínio de agentes com potencial no biocontrole, justificando, no presente trabalho, o isolamento de *Trichoderma* spp. em amostras de composto de um e dois anos. Ainda com base na descrição de Hoitink e Fahy (1986), faz-se necessário o estabelecimento de pilhas em um ambiente com uma flora diversificada, onde o solo seja um ecossistema estabelecido, oferecendo condições para a reconstituição microbiológica do composto por agentes benéficos. Essas condições podem ter contribuído, no presente estudo, para o isolamento de *Trichoderma* spp. do solo de uma floresta adjacente ao pátio de compostagem.

Os isolados do composto M1 e M2 identificados, respectivamente como *Trichoderma asperellum* e *Hypocrea lixii* confirmam a ampla distribuição destas

espécies no ambiente, já atestada por outros autores (Danielson & Davey, 1973; Samuels, 2006).

Pugliese e colaboradores (2008) selecionaram 101 microrganismos de composto de resíduos orgânicos e urbanos e verificaram o potencial dos mesmos na supressão de patógenos presentes no solo.

4.2 Crescimento e esporulação *in vitro* dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados derivados do composto de um e dois anos e do solo apresentaram melhor crescimento micelial, comparado com o isolado TC de origem comercial. Por se encontrar em condições artificiais de armazenagem, alguns conídios do isolado comercial podem levar mais tempo para germinar em meio de cultura.

A semelhança no crescimento micelial dos isolados do solo com os isolados do composto de um e dois anos, pode estar correlacionada com as condições similares das fontes de *Trichoderma* spp. Após passar pelo processo de decomposição, o composto apresenta características semelhantes às do solo (Howard, 2007).

As maiores produções de esporos foram observadas nos isolados do composto de um e dois anos, enquanto a menor produção no isolado comercial (TC). Isolados de *Trichoderma* spp. requerem nutrientes exógenos para germinação, e em condições desfavoráveis, a taxa e porcentagem de germinação, extensão das hifas e esporulação são todas reduzidas (Beagle-Ristaino & Papavizas, 1985; Danielson & Davey, 1973). Como os resíduos compostados oferecem grande oferta de recursos, a maior produção de esporos é intensificada e evidente ao crescer em condições artificiais.

A regulação da germinação de acordo com os níveis de nutrientes disponíveis no meio é uma adaptação necessária para fungos de solo semelhantes a *Trichoderma* (Pugh, 1980). A habilidade para iniciar ou suspender o processo de germinação de

esporos em resposta à flutuação de nutrientes disponíveis no meio, pode ser uma adaptação que permite rápida resposta quando as condições são ou não favoráveis para o crescimento micelial (Steiner & Lockwood, 1969).

Lewis & Papavizas (1984) mostram que *Trichoderma* spp., bem como outros fungos com potencial para o biocontrole, proliferaram abundantemente em casa de vegetação, em vários solos naturais, quando adicionados como micélio jovens mas não como conídios. Assim, estruturas de propagação como micélio podem ser necessárias para aumentar a atividade de agentes de biocontrole, quando aqueles são do gênero *Trichoderma*. Estes achados contribuem para enfatizar a utilização de composto envelhecido, rico em recursos, que garantem populações de espécies de *Trichoderma* em plena atividade.

4.3 Confrontação direta

Os efeitos antagônicos mais intensos dos isolados do solo e do composto, comparados ao isolado comercial (Figura 5), podem estar relacionados ao alto potencial de desenvolvimento micelial e esporulação dessas colônias frente aos patógenos. A velocidade de colonização do substrato e propagação são fatores de grande importância no potencial de biocontrole de *Trichoderma* spp (Martins-Corder & Melo, 1998). No presente trabalho, o isolado TC, de formulação comercial, obteve crescimento micelial inferior aos isolados do composto e do solo (Figura 4), mostrando que isolados da mesma espécie (TC e M1 – *Trichoderma asperellum*) nem sempre apresentam comportamento semelhantes. Logo, na presença, *in vitro*, de um fitopatógeno com rápido crescimento micelial como *S. sclerotiorum*, um agente de biocontrole de baixo crescimento micelial permitiria o rápido crescimento do patógeno. A competição também é um mecanismo essencial em condições naturais (Martins-Corder & Melo,

1998).

Segundo Bossalis (1964), o comportamento dos isolados frente às colônias de patógenos, se devem ao estímulo de alguns hospedeiros à reprodução de seus parasitas. A fonte dos isolados também pode influenciar no seu potencial de biocontrole. De acordo com Ethur (2006), isolados fúngicos encontrados em solos rizosféricos foram mais eficientes no controle de *Fusarium solani* do que os de solo não rizosférico.

Muitos achados já comprovam o efeito de espécies de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos. Ethur e colaboradores (2005) conseguiram atestar 100% de eficácia de oito isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *S. sclerotiorum*. Melo & Faull (2000) observaram a inibição total do crescimento de *R. solani* por *Trichoderma harzianum* (Th-9) e *Trichoderma koningii* (TK5), entre 14 isolados de *Trichoderma*. Melo & Azevedo (1998) também verificaram o efeito antagônico de *Trichoderma* spp. ao crescimento de *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia tuliparum* e *S. rolfsi*. Coley-Smith e colaboradores (1991), ao compararem isolados de *Trichoderma viride* e *Trichoderma harzianum* para o controle de *R. solani* em alface, observaram que o isolado mais eficiente apresentou pequena produção de enzimas extracelulares como β -1-3-glucanase e quitinase, e que isolados de *T. harzianum*, com elevada atividade enzimática, não apresentaram o mesmo comportamento no controle da doença em campo. Ao selecionar isolados de *Trichoderma*, antagônicos a *Pythium aphanidermatum* e *R. solani*, Patrício e colaboradores (2001), também constataram que os isolados que se destacaram nos testes em laboratório apresentaram comportamento variável quando adicionados ao solo.

TC mostrou menor crescimento micelial, no entanto, formou um halo de inibição frente a *S. sclerotiorum* (Figura 8). A formação de um halo de inibição é um indício da supressão do crescimento do fitopatógeno frente à produção de metabólitos não-voláteis (antibiose). Os isolados de *Trichoderma* spp. da compostagem e do solo, não formaram

halo de inibição durante a interação com os fitopatógenos, o que não exclui a possibilidade da antibiose ser um mecanismo adotado por estes isolados.

Micoparasitismo é outro mecanismo de *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos, contudo, não se pode afirmar que isso ocorreu no presente trabalho. O crescimento micelial de *T. harzianum*, favorecido pela concentração de açúcar simples ou substrato, tem sido apontado como inibidor da produção de enzimas envolvidas no micoparasitismo. O estresse nutricional pode ser pré-requisito para expressão de algumas enzimas degradadoras da parede celular (Lorito, 1998 apud Hjeltjord *et al.*, 2001). Segundo Paustian & Schnürer (1987), *Trichoderma* spp. são conhecidos por suas características oligotróficas e em condições de laboratório inadequadas, estes fungos colonizam facilmente até substrato extremamente pobre em nutrientes. Apesar de se conhecer pouco sobre os efeitos dos nutrientes, sobre os mecanismos de antibiose e micoparasitismo, é sabido que nutrientes exógenos são necessários para aumentar a habilidade do fungo em exercer o controle biológico (Hjeltjord *et al.* 2001).

A ação de *Trichoderma* spp. é sensível a pequenas modificações na temperatura, taxa de CO₂, O₂ e disponibilidade de nutrientes, que interferem no seu potencial supressor (Danielson & Davey, 1973) e resultam em diferentes comportamentos. Conforme Hoitink e colaboradores (2006), a concentração e disponibilidade de nutrientes na matéria orgânica do solo (carboidratos, substâncias lignocelulósicas, quitina e lipídios) podem influenciar nos mecanismos de ação de *Trichoderma* (hiperparasitismo, competição, antibiose e indução de resistência).

Liu e colaboradores (2008) ao estudar a diversidade de *Trichoderma* spp. em solos de diferentes sistemas de produção, verificaram que solos submetidos a práticas orgânicas e sustentáveis foram mais eficazes na supressão de doença causada por *Sclerotium rolfsii*, que solos submetidos a práticas convencionais. Segundo os mesmos,

estes resultados estão mais relacionados à grande diversidade microbiana do solo que ao número de propágulos de *Trichoderma* no solo dos diferentes sistemas de produção. Com base nesses autores, a utilização de composto na supressão de fitopatógenos se torna uma notável alternativa devido ao complexo sistema biológico presente no mesmo.

5. Conclusão

Os achados do presente trabalho permitem afirmar que o composto é uma fonte de *Trichoderma* spp. Entre outras possíveis espécies presentes no composto, foi identificado *Trichoderma asperellum* e *Hypocrea lixii*.

Os isolados de *Trichoderma* spp. do composto de um e dois anos e do solo apresentaram comportamento diferente do isolado comercial, quando avaliados individualmente ou frente a patógenos.

Os isolados do composto apresentaram potencial para o controle biológico, utilizando, como um provável mecanismo, a competição por espaço e nutrientes.

6. Referências Bibliográficas

Barnett, H.L.; Hunter, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. 3°. Minnesota: **Burgess Publishing Company**, 1998.

Beagle-Ristaino, J. E.; Papavizas, G. C. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. **Phytopathology**, v. 75, p. 729-732, 1985.

Bell, D. K.; Wells, H. D.; Markham, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 397-382, 1982.

Bossalis, M. C. Hyperparasitism. **Annual Review of Phytopathology**, v. 2, p. 363-367, 1964.

Chung, Y. R.; Hoitink, H. A. J. Interactions between thermophilic fungi and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in a bark compost-amended container medium. **Phytopathology**, v. 80, p. 73-77, 1990.

Coley-Smith, J. R.; Ridout, C. J.; Mitchell, C. M.; Lynch, J. M. Control of bottom rot disease of lettuce (*Rhizoctonia solani*) using preparations of *Trichoderma viride*, *T. harzianum* or tolclafos- metyl. **Plant Pathology**, v.40, p.359–366, 1991.

Craft, C. M.; Nelson, E. B. Microbial properties of composts that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, p. 1550-1557, 1996.

Danielson, R. M.; Davey, C. B. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. **Soil Biol. Biochem.** v. 5, p. 495-504, 1973.

Epstein, E. **The science of composting**. Technologic Publishing, P. A. 487p., 1997.

Ethur, L. Z.; Blume, E.; Muniz, M.; Silva, A. C. F.; Stefanelo, D. R.; Rocha, E. K.

Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

Ethur, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. Tese (Doutorado em Agronomia) UFSM – Santa Maria – RS, 2006.

Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

Hjeljord, L. G.; Stensvand, A.; Tronsmo, A. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v.91, p.1172-1180, 2001.

Hoitink, H. A. J.; Boehm, M. J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 427-446, 1999.

Hoitink, H. A. J.; Fahy, P. C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Ann. Rev. Phytopathology*, v.24, p. 93-114, 1986.

Hoitink, H. A. J.; Kuter, G. A. Effects of composts is growth media on soilborne pathogens. In: Chen, Y.; Avnimelech, Y. (Ed.). **The role of organic matter in modern agriculture**. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht – Boston – Lancaster, 1986.

Hoitink, H. A. J.; Madden, L. V.; Dorrance, A. E. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. **Phytopathology**, v. 96, p. 186-189, 2006.

Howard, S. A. **Um testamento agrícola**. Tradução de Eli Lino de Jesus. Apresentação, revisão técnica e notas de rodapé de Luiz Carlos Pinheiro Machado. São Paulo: Expressão Popular, 360p., 2007. Traduzido da edição especial da Rodali Press, USA, 1976.

Howell, C. R.; Hanson, L. E.; Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v. 90, p. 248-252, 2000.

Lewis, J. A.; Papavizas, G. C. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. **Phytopathology**, v. 74, n.10, p. 1240-1244, 1984.

Liu, B.; Glenn, D.; Buckley, K. *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p.1124–1136, 2008.

Martins-Corder, M. P.; Melo, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.1, p.1-7, 1998.

Melo, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (org). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPD, p.135-156, 1991.

Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, EMBRAPA, p. 17-66, 1998.

Melo, I. S.; Faull, J. L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agricola**, v.57, n.1, p.55-59, 2000.

Noble, R. E.; Coventry. Supression of soil-borne plant diseases with composts: a review. **Biocontrol Sci. Techonol.** v. 15, p. 3-20, 2005.

Papavizas, G. C.; Lumsden, R. D. Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. **Plant Disease**, v.66, p.1019-1020, 1982.

Paustian, K.; Schnürer, J. Fungal growth response to carbon and nitrogen limitation: A theoretical model. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p. 613-620, 1987.

Patrício, F. R. A.; Kimati, H.; Barros, B. C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp.

antagônicos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.223–229, 2001.

Pugh, G. J. F. Strategies in fungal ecology. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v.75, p.1-14, 1980.

Pugliese, M.; Liu, B. P.; Gullino, M. L.; Garibaldi, A. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 115, n. 5, p. 220- 228, 2008.

Samuels, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, p. 195-206, 2006.

Steiner, G. W.; Lockwood, J. L. Soil fungistasis: Sensitivity of spores in relation to germination time and size. **Phytopathology**, v.59, p.1084-1092, 1969.

Stratton, M. L.; Barker, A. V.; Recheigl, J. E. Compost. In: Hornby, D.; Bateman, G. L. **Biological Indicators of Soil Health**. cap. 7, 1997.

Capítulo IV – Considerações Finais

O presente trabalho foi o início de vários outros estudos que poderão buscar relacionar a ação supressora do composto à presença de *Trichoderma* spp. no meio.

A fase inicial de execução dos experimentos foi acompanhada pela dificuldade, em se encontrar uma metodologia adequada para o isolamento do *Trichoderma* spp. de compostos orgânicos. Sanado este entrave, o isolamento foi possível a partir de métodos simples e de baixo custo, como o plaqueamento direto de fragmentos do composto. Assim, foi possível concluir que *Trichoderma* spp. está presente em matéria orgânica compostada, principalmente com mais de um ano de maturação, tendo sido identificado duas espécies no meio, *Trichoderma asperellum* e *Hypocrea lixii*.

Os isolados do composto apresentaram potencial para o controle biológico, utilizando, como um provável mecanismo, a competição por espaço e nutrientes. Nem todos os testes laboratoriais, previamente planejados para serem realizados, foram gerados com sucesso. Utilizamos o método denominado método do papel celofane, para verificar a produção de metabólitos pelos isolados de *Trichoderma* do composto. O método foi repetido três vezes, mas foi desconsiderado devido a alguns fatores que tiveram origem nos próprios materiais utilizados.

Subsequente às análises laboratoriais, foram realizados testes em casa de vegetação. Nestes, o intuito foi verificar a influência dos resíduos compostados no crescimento de feijões acometidos por *Sclerotinia sclerotiorum*. Porém, a doença causada pelo patógeno, não se manifestou nas plantas em nenhum dos tratamentos (concentrações diferentes de composto) nem mesmo no controle.

Considerando o limite de tempo para a conclusão dos resultados, não foi possível insistir nos experimentos. Desta forma, para ressaltar os resultados do presente

trabalho, seriam necessárias novas etapas laboratoriais para que as características e o comportamento dos isolados de *Trichoderma* spp. encontrados, possam ser melhor elucidados. Paralelo à etapa laboratorial, novos testes em casa de vegetação podem ser realizados, a fim de buscar maior semelhança do ambiente natural onde as interações entre composto, *Trichoderma*, plantas e fitopatógenos ocorrem. Além dos testes descritos acima, em casa de vegetação, a ação de *Trichoderma* sp. pode ser avaliada em composto natural e fumigado para verificar a influência do ecossistema no seu crescimento; no crescimento de plantas na presença e ausência de *Trichoderma* sp. no solo; no controle biológico exercido por *Trichoderma* spp. sobre plantas acometidas por vários patógenos; assim como, verificar os fatores que afetam o crescimento do fungo, em laboratório e em casa de vegetação, como temperatura, umidade e a presença de outros microrganismos.

Aos próximos estudos, ainda sugiro a utilização de composto como unidades experimentais e não amostras do composto. Dessa forma, poderão ser utilizados resíduos compostados derivados de diferentes materiais orgânicos, e de pátios de diferentes municípios, como Garopaba, Turvo, Grão-Pará e Angelina e assim, verificar a influência da matéria prima na supressividade dos compostos orgânicos.